

11

WO 03/64650
 = DE 10203352

2003-732841/70 BASF AG	B01 D16 E15 (B04 D21) 2002.01.29 2002-1003352(+2002DE-1003352) (2003.07.31) C12N 15(62, 1/19, 15/81, C12P 33/00, C12N 15(52	BADI 2002-01.29 *DE 10203352-A1 H12E, 5-H14A2, 8-B, 8-B9A1) E(1) .4	USE Preparation of 7-dehydrocholesterol, useful as an intermediate for Vitamin D ₃ , and its intermediates or products, comprises growth of organisms with increased activity of specific enzymes C2003-202034 Addn. Data: LANG C, VEEN M	B(1-D2, 4-E2E, 4-E8, 4-F9E) D(5-A2, 5-C, 5-H12A, 5-H12E, 5-H14A2, 8-B, 8-B9A1) E(1)
NOVELTY	Preparation of 7-dehydrocholesterol (I), and/or its biosynthetic intermediates and/or secondary products, comprises culturing organisms that have, relative to the wild type, increased activity of at least one of Δ8-Δ7-isomerase (A), Δ5-desaturase (B) and/or Δ24-reductase (C).	ADVANTAGE 7-dehydrocholesterol (I) is an intermediate for Vitamin D ₃ , and its intermediates/secondary products (e.g. zymosterol, lanosterol, squalene, farnesol, geranial, cholesta-trienol or -tetraenol), useful for synthesis of terpenes; in dermatology and cosmetics; in synthesis of saponins and steroid hormones, and as emulsifiers in skin creams.	INDEPENDENT CLAIMS are also included for: (1) Nucleic acid construct (NC1) containing at least one sequence encoding (A)-(C), functionally linked to one or more regulatory signals that ensure transcription and translation; (2) Combination of at least one NC1 with at least one similar construct	Increasing activity of the specified genes improves product yields.
DETAILED DESCRIPTION		EXAMPLE The <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain GRFHIE1E11erg5erg6 DE 10203352-A+		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

differs from the wild type by containing:

- (1) ura3;
 - (2) a truncated sequence for 3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA reductase, replacing leu2; and
 - (3) genes for squalene epoxidase and lanosterol C14-demethylase, replacing genes for C24-methyltransferase and $\Delta 22$ -desaturase. It was transformed with vector pFlat4-D24R, which contains the murine gene for $\Delta 24$ -reductase, under control of the ADH1 promoter and tryptophan terminator, and transformants cultured for 5 days at 28 °C.
- The steroids formed were extracted and analyzed by gas chromatography to indicate a large increase in the amount of 7-dehydrocholesterol (I) formed, also smaller increases in amounts of cholesta-8-enol and cholesta-5,7,24-trienol. Even greater increases in the amount of (I) formed were achieved when the yeast was additionally transformed to over-express $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerase and $\Delta 5$ -desaturase.

these enzymes. Activity is increased by at least 5, (best 600) %. The organism also has reduced activity of at least one of C24-methyltransferase and $\Delta 22$ -desaturase, most especially it lacks functional genes for both of these (particularly as the result of knockout recombination), and/or increased activity of at least one of (D)-(H), particularly of (D) and (E), increased in the same way as for (A)-(C), or, for (D), by introducing a sequence, especially one encoding the catalytic region of (D), that is subjected to reduced regulation, relative to the wild-type gene.

Preferred Materials: The nucleic acids introduced to increase expression of (A)-(C) are sequences that encode, respectively, proteins of 230 (murine), 230 (human) or 222 (*Saccharomyces cerevisiae*) amino acid (aa) proteins, or their derivatives formed by substitution, insertion or deletion of aa, provided they have at least 30% identity at the aa level and retain enzymatic activity. Especially the nucleic acids are sequences of 693, 693 or 669 nucleotides (nt). Sequences for increasing activity of (D)-(F) encode proteins of 299 (human), 299 (murine) and 365 (*S. cerevisiae*) aa, respectively, or their derivatives as above, especially sequences of 900, 900 and 1098 nt.

All the protein and nucleic acid sequences are reproduced. The host organism is yeast, and the sequences introduced may be codon-

DE 10203352-A1/1

TECHNOLOGY FOCUS

Biotechnology - Preferred Method: The organism has increased activity of at least 2, especially all 3, of (A)-(C), particularly as a result of increased gene expression or by introducing nucleic acid encoding

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2003-732841/70

optimized. NC1 optionally includes at least one sequence encoding (D)-(H). (A) converts zymosterol to cholesta-7,24-dienol (X); (B) converts (X) to cholesta-5,7,24-trienol (Y), and (C) converts (Y) to (I), zymosterol to lathosterol and (X) to cholesta-7-enol.
Preparation: The transgenic yeast are prepared by standard transformation with NC1/NC2, especially as part of a vector or plasmid.
(120pp1251DwgNo.07)

|DE 102033352-A2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. August 2003 (07.08.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/064650 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/52, 15/81, 9/90, 9/02, C12P 33/00
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/00592
- (22) Internationales Anmeldedatum:
22. Januar 2003 (22.01.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
102 03 352.8 29. Januar 2002 (29.01.2002) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LANG, Christine [DE/DE]; Gustav-Meyer-Allee 25, 13355 Berlin (DE). VEEN, Markus [DE/DE]; Becherweg 30, 13407 Berlin (DE).
- (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SI, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD; TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF 7-DEHYDROCHOLESTEROL AND/OR THE BIOSYNTHETIC INTERMEDIATE OR SUBSEQUENT PRODUCTS THEREOF IN TRANSGENIC ORGANISMS

A1 (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON 7-DEHYDROCHOLESTEROL UND/ODER DESSEN BIOSYNTHETISCHEN ZWISCHEN- UND/ODER FOLGEPRODUKTEN IN TRANSGENEN ORGANISMEN

WO 03/064650 (57) Abstract: The invention relates to a method for the production of 7-dehydrocholesterol and/or the biosynthetic intermediate or subsequent products thereof by the cultivation of organisms, in particular, yeasts which show an increased activity of at least one activity, selected from delta-8/delta-7 isomerisation activity, delta-5 desaturase activity or delta-24 reductase activity. The invention further relates to the nucleic acid constructs necessary for production of the genetically-modified organisms and the genetically-modified organisms, in particular, the yeasts themselves.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von Organismen, insbesondere Hefen, die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus delta8-delta7-Isomerase Aktivität, delta5-desaturase-Aktivität oder delta24-reduktase-Aktivität aufweisen. Ferner betrifft die Erfindung die zur Herstellung der genetisch veränderten Organismen benötigten Nukleinsäurekonstrukte, sowie die genetisch veränderten Organismen, insbesondere Hefen selbst.

Verfahren zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten in transgenen Organismen

5

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von Organismen, insbesondere Hefen. Ferner betrifft die Erfindung die zur Herstellung der genetisch veränderten Organismen benötigten Nukleinsäurekonstrukte, sowie die genetisch veränderten Organismen, insbesondere Hefen selbst.

15

7-Dehydrocholesterol, auch als Cholesta-5,7-dienol oder Provitamin D₃ bezeichnet, dessen biosynthetische Zwischenprodukte des Sterolstoffwechsels, wie beispielsweise Zymosterol, Farnesol, Geraniol, Squalen, Lanosterol, Cholesta 5,7,24-trienol und Cholesta-5,7,22,24-tetraenol sowie dessen biosynthetischen Folgeprodukte des Sterolstoffwechsels, wie Vitamin D₃ und Cholesterin sind Verbindungen mit hohem wirtschaftlichen Wert.

Die wirtschaftliche Bedeutung von 7-Dehydrocholesterol liegt vor allem in der Gewinnung von Vitamin D₃ aus 7-Dehydrocholesterol über UV-Bestrahlung.

Squalen wird als Synthesebaustein für die Synthese von Terpenen benutzt. In hydrierter Form findet es als Squalan Verwendung in Dermatologie und Kosmetik sowie in verschiedenen Derivaten als Inhaltstoff von Haut- und Haarpflegemitteln.

Weiterhin wirtschaftlich nutzbar sind Sterole, wie Zymosterol und Lanosterol, wobei Lanosterol Roh- und Synthesepivotal für die chemische Synthese von Saponinen und Steroidhormonen ist. Wegen seiner guten Hautpenetration und Spreadingeigenschaften dient Lanosterol als Emulsionshilfs- und Wirkstoff für Hautcremes.

Ein wirtschaftliches Verfahren zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten ist daher von großer Bedeutung.

Besonders wirtschaftliche Verfahren sind biotechnologische Verfahren unter Ausnutzung von durch genetische Veränderung optimierter Organismen, die 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetische Zwischen- und/oder Folgeprodukte herstellen.

Während der Sterolstoffwechsel in Bakterien, Pilzen, Hefen und einigen Insekten im wesentlichen von Zymosterol über Fecosterol, Episterol, Ergosta-5,7-dienol und Ergosta-5,7,22,24-tetraen-3 β -ol zu Ergosterol (Provitamin D₂) führt, führt der Sterolstoffwechsel 5 in Säugern im wesentlichen von Zymosterol über Cholesta-7,24-dienol, Lathosterol zu 7-Dehydro-Cholsterol (Provitamin D₃).

7-Dehydro-Cholsterol (Provitamin D₃) wird durch die 7-Dehydro-Cholesterolreduktase in Cholesterol und Cholesterol in Steroidhormone, Corticoide und Gallensäuren wie Progesteron, Testosteron, Estradiol, Aldosteron, Cortison und Cholat überführt.

Einige Gene des 7-Dehydrocholsterol-Stoffwechsels in Säugern sind bekannt und kloniert, wie beispielsweise

15 Nukleinsäuren kodierend eine humane Δ 8- Δ 7-Isomerase (auch Emopamil Binding Protein (EBP) genannt), ACCESSION NM_006579 und eine murine Δ 8- Δ 7-Isomerase (Braverman,N. et al., (1999): Mutations in the gene encoding 3beta-hydroxysteroid-delta8,delta7-isomerase 20 cause X-linked dominant Conradi-Hunermann syndrome.Nat.Genet.22(3),291-294.,

Nukleinsäuren kodierend eine humane Δ 5-Desaturase (auch Sterol-C5-Desaturase genannt), ACCESSION AB016247 und eine murine Δ 5-Desaturase (Nishi,S. et al., (2000): cDNA cloning of the mammalian sterol C5-desaturase and the expression in yeast mutant. Biochim.Biophys.Acta 1490(1-2),106-108),

30 Nukleinsäuren kodierend eine humane Δ 24-Reduktase (auch 24-Dehydrocholesterol Reduktase (DHCR24) genannt), ACCESSION NM_014762 und eine murine Δ 24-Reduktase (Waterham,H.R. et al. (2001): Mutations in the 3beta-hydroxysterol Delta24-reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis. Am.J.Hum.Genet.69(4),685-694 und

35 Nukleinsäuren kodierend eine humane Sterol-Acyltransferase (Chang, C.C. et al., Molecular cloning and functional expression of human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster ovary cells, J. Biol. Chem. 1993, Oct 5;268(28):20747-55) und eine murine Sterol-Acyltransferase (Uelmen, P.J.: Tissue-specific expression and cholesterol regulation of acylcoenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) in mice. Molecular cloning of mouse ACAT cDNA, chromosomal localization, and regulation of ACAT in vivo and in vitro, J. Biol. Chem. 1995 Nov 45 3;270(44):26192-201.

Die Gene des Ergosterol-Stoffwechsels in Hefe sind weitgehend bekannt und kloniert, wie beispielsweise

Nukleinsäuren kodierend eine Δ 8- Δ 7-Isomerase (ERG2) (Ashman, W.H. et al. (1991): Cloning and disruption of the yeast C-8 sterol isomerase gene. *Lipids*. Aug; 26(8):628-32.),

Nukleinsäuren kodierend eine Δ 5-Desaturase (ERG3) (Arthington, B.A. et al. (1991): Cloning, disruption and sequence of the gene encoding yeast C-5 sterol desaturase. *Gene*. Jun 15; 102(1):39-44.),

Nukleinsäuren kodierend eine Δ 24-Reduktase (ERG 4) (Lai, M.H. et al., (1994): The identification of a gene family in the *Saccharomyces cerevisiae* ergosterol biosynthesis pathway.

Gene. Mar 11; 140(1):41-9.),

Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase (*HMG*) (Bason M.E. et al., (1988) Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis. *Mol Cell Biol* 8:3797-3808,

Nukleinsäuren kodierend eine trunkierte HMG-CoA-Reduktase (*t-HMG*) (Polakowski T, Stahl U, Lang C. (1998) Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*. Jan; 49(1):66-71,

Nukleinsäuren kodierend eine Lanosterol-C14-Demethylase (ERG11) (Kalb VF, Loper JC, Dey CR, Woods CW, Sutter TR (1986) Isolation of a cytochrome P-450 structural gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 45(3):237-45,

Nukleinsäuren kodierend eine Squalensynthetase (ERG9) (Jennings, S.M., (1991): Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA*. Jul 15; 88(14):6038-42),

Nukleinsäuren kodierend eine Sterol-Acyltransferase (SAT1) und (SAT2) (Yang, H.: Sterol esterification in yeast: a two-gene process. *Science*. 1996 May 31; 272(5266):1353-6.) sowie eine weitere Sterol-Acyltransferase (J. Biol. Chem. 1996, Sep 27; 271(39):24157-63),

Nukleinsäuren kodierend eine Squalenepoxidase (ERG1) (Jandrositz, A., et al (1991) The gene encoding squalene epoxidase from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. Gene 107:155-160),

5

Nukleinsäuren kodierend eine C24-Methyltransferase (ERG6) (Hardwick, K.G. et al.,: SED6 is identical to ERG6, and encodes a putative methyltransferasere quired for ergosterol synthesis.Yeast.Feb;10(2):265-9) und

10

Nukleinsäuren kodierend eine Delta22-Desaturase (ERG5) (Skaggs, B.A. et al.,: Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* C-22 sterol desaturase gene,encoding a second cytochrome P-450 involved in ergosterol biosynthesis, Gene.1996

15 Feb22;169(1):105-9.).

Weiterhin sind Verfahren bekannt, die eine Erhöhung des Gehalts an spezifischen Intermediaten und Endprodukten des Sterolstoffwechsels in Hefen und Pilzen zum Ziel haben.

20

Es ist aus EP 486 290 bekannt, daß der Gehalt an Squalen und weiteren spezifischen Sterolen, wie beispielsweise Zymosterol in Hefen erhöht werden kann, indem man die Expressionsrate der HMG-CoA-Reduktase erhöht und gleichzeitig den Stoffwechselweg der Zymosterol-C24-Methyltransferase (ERG6) und der Ergosta-5,7,24(28)-trienol-22-dehydrogenase (ERG5) unterbricht.

Aus T. Polakowski, Molekularbiologische Beeinflussung des Ergosterolstoffwechsels der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Shaker 30 Verlag Aachen, 1999, Seite 59 bis 66 ist bekannt, daß die Erhöhung der Expressionsrate der HMG-CoA-Reduktase alleine ohne Unterbrechung des abfließenden Stoffwechselflußes wie in EP 486 290 lediglich zu einer leichten Erhöhung des Gehalts an frühen Sterolen, sowie Squalen führt, während sich der Gehalt an späteren 35 Sterolen, wie Ergosterol nicht signifikant ändert, bzw. bei Ergosterol sogar tendenziell abnimmt.

WO 99/16886 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Ergosterol in Hefen, die eine Kombination der Gene tHMG, ERG9, SAT1 und 40 ERG1 überexprimieren.

Tainaka et al., J, Ferment. Bioeng. 1995, 79, 64-66, beschreiben ferner, daß die Überexpression von ERG11 (Lanosterol-C14-Demethylase) zu einer Anreicherung von 4,4-Dimethylzymosterol jedoch 45 nicht von Ergosterol führt. Die Transformante zeigte gegenüber

dem Wildtyp einen, je nach Fermentationsbedingungen, um den Faktor 1,1 bis 1,47 gesteigerten Zymosterolgehalt.

Avruch et al, Can.J.Biochem 1976, 54(7), 657-665 sowie Xu et al, 5 Biochem. Biophys. Res. Commun. 1988, 155(1), 509-517 beschreiben, daß durch spezifische Hemmung der C24-Methyltransferase und auch durch eine Mutation am Genlocus erg6 in *S. cerevisiae* neben Zymosterol, auch Spuren von Cholesterol nachzuweisen sind.

10 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zu Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten mit vorteilhaften Eigenschaften, wie einer höheren Produktausbeute, zur Verfügung zu stellen.

15

Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten gefunden, indem man Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität, 20 Δ 5-Desaturase-Aktivität und Δ 24-Reduktase-Aktivität aufweisen.

Eine erhöhte Aktivität gegenüber dem Wildtyp bedeutet für den Fall, daß der Ausgangsorganismus diese Aktivität nicht aufweist, 25 daß die Aktivität verursacht wird. Für den Fall, daß der Ausgangsorganismus die Aktivität bereits aufweist, bedeutet eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Aktivität eine um einen Prozentsatz erhöhte Aktivität.

30 Unter Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Δ 8- Δ 7-Isomerase, auch Δ 8- Δ 7-Sterolisomerase genannt, verstanden.

Unter einer Δ 8- Δ 7-Isomerase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Zymosterol in Cholesta-7,24-dienol 35 umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Δ 8- Δ 7-Isomerase umgesetzte Menge Zymosterol bzw. gebildete Menge Cholesta-7,24-dienol ver-40 standen.

Bei einer erhöhten Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Δ 8- Δ 7-Isomerase die umgesetzte Menge Zymosterol 45 bzw. die gebildete Menge Cholesta-7,24-dienol erhöht.

6

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugter mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, insbesondere 5 mindestens 600% der Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität des Wildtyps.

Unter Δ 5-Desaturase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Δ 5-Desaturase, auch Lathosterol-5-desaturase oder Sterol-C5-Desaturase genannt, verstanden.

10 Unter einer Δ 5-Desaturase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Cholesta-7,24-dienol in Cholesta-5,7,24-trienol umzuwandeln.

15 Dementsprechend wird unter Δ 5-Desaturase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Δ 5-Desaturase umgesetzte Menge Cholesta-7,24-dienol bzw. gebildete Menge Cholesta-5,7,24-trienol verstanden.

20 Bei einer erhöhten Δ 5-Desaturase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Δ 5-Desaturase die umgesetzte Menge Cholesta-7,24-dienol bzw. die gebildete Menge Cholesta-5,7,24-trienol erhöht.

25 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Δ 5-Desaturase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugter mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, insbesondere 30 mindestens 600% der Δ 5-Desaturase-Aktivität des Wildtyps.

Unter Δ 24-Reduktase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Δ 24-Reduktase, auch 24-Dehydrocholesterol-Reduktase genannt, verstanden.

35 Unter einer Δ 24-Reduktase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, die Doppelbindung zwischen C24 und C25 von Cholesterin-Verbindungen in eine Einfachbindung zu überführen, wie beispielsweise Cholesta-5,7,24-trienol in 7-Dehydrocholesterol oder Zymosterol in Lathosterol oder Cholesta-7,24-dienol in Cholesta-7-enol umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Δ 24-Reduktase-Aktivität vorzugsweise die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Δ 24-Reduktase umgesetzte Menge Cholesta-5,7,24-trienol bzw. gebildete Menge 7-Dehydrocholesterol verstanden.

Bei einer erhöhten $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein $\Delta 24$ -Reduktase die umgesetzte Menge Cholesta-5,7,24-trienol bzw. die gebildete Menge 7-Dehydrocholesterol 5 erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugter 10 mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, insbesondere mindestens 600% der $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität des Wildtyps.

Unter einem Wildtyp wird der entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangsorganismus verstanden. Vorzugsweise und insbesondere 15 in Fällen in denen der Organismus oder der Wildtyp nicht eindeutig zuordenbar ist, wird unter Wildtyp für die Erhöhung der $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, die Erhöhung der $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, die Erhöhung der $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, die Reduzierung der nachstehend beschriebenen C24-Methyltransferase-Aktivität, 20 die Reduzierung der nachstehend beschriebenen $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen Squalenepoxidase-Aktivität, die Erhöhung der nach- 25 stehend beschriebenen Squalensynthetase-Aktivität und die Erhöhung der nachstehend beschriebenen Sterol-Acyltransferase-Aktivität sowie für die Erhöhung des Gehalts an 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten ein Referenzorganismus verstanden. Dieser Referenzorganismus 30 ist vorzugsweise der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* AH22.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, 35 $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Organismen kulti- viert, die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase- Aktivität, $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität oder $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität 40 aufweisen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens weisen die Organismen gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens zwei der Aktivitäten, ausgewählt aus 45 der Gruppe $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität auf.

Besonders bevorzugte Kombinationen sind eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase-Aktivität}$ und $\Delta 5\text{-Desaturase-Aktivität}$, $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase-Aktivität}$ und $\Delta 24\text{-Reduktase-Aktivität}$ sowie eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte $\Delta 5\text{-Desaturase-Aktivität}$ und $\Delta 24\text{-Reduktase-Aktivität}$.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform des erfundungsgemäßen Verfahrens weisen die Organismen gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase-Aktivität}$, $\Delta 5\text{-Desaturase-Aktivität}$ und $\Delta 24\text{-Reduktase-Aktivität}$ auf.

Die Erhöhung der $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase-Aktivität}$, $\Delta 5\text{-Desaturase-Aktivität}$ und $\Delta 24\text{-Reduktase-Aktivität}$ sowie der nachstehend beschriebenen HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, Squalenepoxidase-Aktivität, Squalensynthetase-Aktivität und Sterol-Acyltransferase-Aktivität kann unabhängig von einander durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression der entsprechenden Nukleinsäuren, also Nukleinsäuren codierend eine $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase}$, $\Delta 5\text{-Desaturase}$, $\Delta 24\text{-Reduktase}$, HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squalenepoxidase, Squalensynthetase oder Sterol-Acyltransferase gegenüber dem Wildtyp.

Die Erhöhung der Genexpression der entsprechenden Nukleinsäure gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung der entsprechenden Gene durch Aktivatoren, also durch Induzierung des $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase-Gens}$, des $\Delta 5\text{-Desaturase-Gens}$, des $\Delta 24\text{-Reduktase-Gens}$, des HMG-CoA-Reduktase-Gens, des Lanosterol-C14-Demethylase-Gens, des Squalenepoxidase-Gens, des Squalensynthetase-Gens oder des Sterol-Acyltransferase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Genkopien der entsprechenden Nukleinsäuren, also durch Einbringen einer oder mehrerer Nukleinsäuren codierend eine $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase}$, $\Delta 5\text{-Desaturase}$, $\Delta 24\text{-Reduktase}$, HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squalenepoxidase, Squalensynthetase oder Sterol-Acyltransferase in den Organismus.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase}$, $\Delta 5\text{-Desaturase}$, $\Delta 24\text{-Reduktase}$, HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squalenepoxidase, Squalensynthetase oder Sterol-Acyltransferase wird erfundungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Organismus eigenen, insbesondere der Hefen eigenen, endogenen $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerasen}$, $\Delta 5\text{-Desaturasen}$, $\Delta 24\text{-Reduktasen}$, HMG-CoA-Reduktasen, Lanosterol-C14-Demethyl-

lasen, Squalenepoxidasen, Squalensynthetasen oder Sterol-Acyltransferasen verstanden.

Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase, $\Delta 5$ -Desaturase, $\Delta 24$ -Reduktase, HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squalenepoxidase, Squalensynthetase oder Sterol-Acyltransferase kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des entsprechenden Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch
10 Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase, $\Delta 5$ -Desaturase, $\Delta 24$ -Reduktase, HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squalenepoxidase, Squalensynthetase oder Sterol-Acyltransferase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

20 Des Weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression endogener $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-, $\Delta 5$ -Desaturase-, $\Delta 24$ -Reduktase-, HMG-CoA-Reduktase-, Lanosterol-C14-Demethylase-, Squalenepoxidase-, Squalensynthetase- oder Sterol-Acyltransferase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein im nicht transformierten Organismus nicht vor-
25 kommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt.

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine
35 $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase durch Einbringen von einer oder mehreren Nukleinsäuren codierend eine $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase in den Organismus.

Dazu kann prinzipiell jedes $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase codiert, verwendet werden.

45 Bei genomischen $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage

versetzt werden kann, die entsprechenden $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase}$ zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

- 5 Beispiele für $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase}$ -Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine murine $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase}$ (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 1, Protein: Seq. ID. No. 2) oder eine humane $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase}$ (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 3, Protein: Seq. ID. No. 4) (Braverman, N. et al., (1999): Mutations in the gene encoding 3beta-hydroxysteroid-delta8,delta7-isomerase cause X-linked dominant Conradi-Hunermann syndrome, Nat. Genet. 22(3), 291-294), aber auch Nukleinsäuren die Proteine codieren, die beispielsweise aufgrund einer breiten Substratspezifität die Aktivität einer $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase}$ aufweisen, wie beispielsweise Nukleinsäuren, codierend eine 15 C8-Isomerase aus *Saccharomyces cerevisiae* (*ERG2*), Nukleinsäure: Seq. ID. No. 5, Protein: Seq. ID. No. 6), (Ashman, W.H. et al. (1991): Cloning and disruption of the yeast C-8 sterol isomerase gene. Lipids. Aug; 26(8):628-32.).
- 20 In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase}$ -Gen vor.

Die Anzahl der $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase}$ -Gene in den erfindungsgemäßen 25 transgenen Organismen beträgt mindestens zwei, vorzugsweise mehr als zwei, besonders bevorzugt mehr als drei, ganz besonders bevorzugt mehr als fünf.

Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können bei- 30 spielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

Bevorzugte $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase}$ -Gene sind Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, die eine hohe Substratspezifität für Zymosterol aufweisen. Demnach sind insbesondere $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase}$ -Gene und die entsprechenden $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerasen}$ aus Säugetieren und deren funktionelle Äquivalente bevorzugt.

Dementsprechend bevorzugt verwendet man im vorstehend beschriebenen Verfahren Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend 40 die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, und die die enzymatische Eigenschaft einer $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase}$ aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 2 stellt die Aminosäuresequenz der Δ8-Δ7-Isomerase aus *Mus musculus* dar.

Weitere Beispiele für Δ8-Δ7-Isomerasen und Δ8-Δ7-Isomerase-Gene
5 lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 2 leicht auffinden.

10

Die Δ8-Δ7-Isomerase aus *Homo sapiens* (Seq. ID. No. 4) weist beispielsweise mit der Δ8-Δ7-Isomerase aus *Mus musculus* (Seq. ID. No. 2) eine Identität von 74 % auf.

15 Weitere Beispiele für Δ8-Δ7-Isomerasen und Δ8-Δ7-Isomerase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 1 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

20

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche 25 Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte 30 Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere 35 Aminosäuren ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinlänge verstanden, 40 insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Lascergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

12

Multiple alignment parameter:

Gap penalty 10

Gap length penalty 10

Pairwise alignment parameter:

5 K-tuple 1

Gap penalty 3

Window 5

Diagonals saved 5

- 10 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz
15 eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase aus *Mus musculus* (SEQ. ID. NO. 2).

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 25 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht
30 ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in Hefe exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Hefe bei der Rückübersetzung zu verwenden.

- 35 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 in den Organismus ein.

- 40 Die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 stellt die cDNA aus *Mus musculus* dar, die die $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase der Sequenz SEQ ID NO. 2 codiert.

Alle vorstehend erwähnten $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligo-

13

- nukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-
5 Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.
- 10 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Δ5-Desaturase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Δ5-Desaturase.
- 15 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Δ5-Desaturase durch Einbringen von einer oder mehreren Nukleinsäuren codierend eine Δ5-Desaturase in den Organismus.
- 20 Dazu kann prinzipiell jedes Δ5-Desaturase-Gen, also jede Nukleinsäure die eine Δ5-Desaturase codiert, verwendet werden.
- Bei genomischen Δ5-Desaturase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß
25 der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Δ5-Desaturase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.
- 30 Beispiele für Δ5-Desaturase-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine murine Δ5-Desaturase (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 7, Protein: Seq. ID. No. 8 oder eine humane Δ5-Desaturase (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 9, Protein: Seq. ID. No. 10) (Nishi, S. et al., (2000): cDNA cloning of the mammalian sterol C5-desaturase and the expression in yeast mutant. *Biochim. Biophys. Acta*, 1490, (1-2), 106-108), aber auch Nukleinsäuren die Proteine codieren, die beispielsweise aufgrund einer breiten Substratspezifität die Aktivität einer Δ5-Desaturase aufweisen, wie beispielsweise Nukleinsäuren, codierend eine C5-Desaturase aus *Saccharomyces cerevisiae*
35 (ERG3), (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 11, Protein: Seq. ID. No. 12), (Arthington, B.A. et al. (1991): Cloning, disruption and sequence of the gene encoding yeast C-5 sterol desaturase. *Gene*. Jun 15; 102(1):39-44.).

14

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Δ5-Desaturase-Gen vor.

- 5 Die Anzahl der Δ5-Desaturase-Gene in den erfindungsgemäßen transgenen Organismen beträgt mindestens zwei, vorzugsweise mehr als zwei, besonders bevorzugt mehr als drei, ganz besonders bevorzugt mehr als fünf.
- 10 Bevorzugte Δ5-Desaturase-Gene sind Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, die eine hohe Substratspezifität für Cholesta-7,24-dienol aufweisen. Demnach sind insbesondere Δ5-Desaturase-Gene und die entsprechenden Δ5-Desaturasen aus Säugetieren und deren funktionellen Äquivalenten bevorzugt.
- 15 Dementsprechend bevorzugt verwendet man im vorstehend beschriebenen Verfahren Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 8 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 8, und die die enzymatische Eigenschaft einer Δ5-Desaturase aufweisen.
- 20 25 Die Sequenz SEQ. ID. NO. 8 stellt die Aminosäuresequenz der Δ5-Desaturase aus *Mus musculus* dar.
- Weitere Beispiele für Δ5-Desaturasen und Δ5-Desaturase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz bekannt ist durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 2 leicht auffinden.
- 30 35 Die Δ5-Desaturase aus *Homo sapiens* (Seq. ID. No. 10) weist beispielweise mit der Δ5-Desaturase aus *Mus musculus* (Seq. ID. No. 8) eine Identität von 84% auf.

Weitere Beispiele für Δ5-Desaturasen und Δ5-Desaturase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 7 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

40 45 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 8 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Ver-

gleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 8, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

- 5 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Δ5-Desaturase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Δ5-Desaturase aus *Mus musculus* (SEQ. ID. NO. 8).
- 10 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend 15 der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

- 20 Soll das Protein beispielsweise in Hefe exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Hefe bei der Rückübersetzung zu verwenden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine 25 Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 7 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 7 stellt die cDNA aus *Mus musculus* dar, die die Δ5-Desaturase der Sequenz SEQ ID NO. 8 codiert.

- 30 Alle vorstehend erwähnten Δ5-Desaturase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

16

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Δ24-Reduktase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Δ24-Reduktase.

5

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Δ24-Reduktase durch Einbringen von einer oder mehreren Nukleinsäuren codierend eine Δ24-Reduktase in den Organismus.

10

Dazu kann prinzipiell jedes Δ24-Reduktase-Gen, also jede Nukleinsäure die eine Δ24-Reduktase codiert, verwendet werden.

Bei genomischen Δ24-Reduktase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Δ24-Reduktase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

20

Beispiele für Δ24-Reduktase-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine murine Δ24-Reduktase (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 13, Protein: Seq. ID. No. 14 oder eine humane Δ24-Reduktase (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 15, Protein: Seq. ID. No. 16), (Waterham, H.R. et al.: Mutations in the 3beta-Hydroxysterol Delta24-Reductase Gene Cause Desmosterolosis, an Autosomal Recessive Disorder of Cholesterol Biosynthesis, Am. J. Hum. Genet. 69 (4), 685-694 (2001)), aber auch Nukleinsäuren die Proteine codieren, die beispielsweise aufgrund einer breiten Substratspezifität die Aktivität einer Δ24-Reduktase aufweisen, wie beispielsweise Nukleinsäuren, codierend eine Δ24-Reduktase aus *Saccharomyces cerevisiae* (ERG4), (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 17, Protein: Seq. ID. No. 18), (Lai, M.H. et al., (1994): The identification of a gene family in the *Saccharomyces cerevisiae* ergosterol biosynthesis pathway. Gene. Mar11;140(1):41-9.).

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Δ24-Reduktase-Gen vor.

40

Die Anzahl der Δ24-Reduktase-Gene in den erfindungsgemäßen transgenen Organismen beträgt mindestens zwei, vorzugsweise mehr als zwei, besonders bevorzugt mehr als drei, ganz besonders bevorzugt mehr als fünf.

45

Bevorzugte Δ24-Reduktase-Gene sind Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, die eine hohe Substratspezifität für Cholesta-5,7,24-trienol aufweisen. Demnach sind insbesondere Δ24-Reduktase-Gene und die entsprechenden Δ24-Reduktasen aus Säugetieren und deren funktionellen Äquivalenten bevorzugt.

Dementsprechend bevorzugt verwendet man im vorstehend beschriebenen Verfahren Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 14 oder eine von dieser 10 Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 14, und die die 15 enzymatische Eigenschaft einer Δ24-Reduktase aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 14 stellt die Aminosäuresequenz der Δ24-Reduktase aus *Mus musculus* dar.

20 Weitere Beispiele für Δ24-Reduktasen und Δ24-Reduktase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz bekannt ist durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 14 leicht auffinden.

25 Die Δ24-Reduktase aus *Homo sapiens* (Seq. ID. No. 16) weist beispielsweise mit der Δ24-Reduktase aus *Mus musculus* (Seq. ID. No. 14) eine Identität von 96% auf.

30 Weitere Beispiele für Δ24-Reduktasen und Δ24-Reduktase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 13 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

35 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 14 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 14, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz 40 eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Δ24-Reduktase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen 45 eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Δ24-Reduktase aus *Mus musculus* (SEQ. ID. NO. 14).

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

10 Soll das Protein beispielsweise in Hefe exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Hefe bei der Rückübersetzung zu verwenden.

15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 13 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 13 stellt die genomische DNA aus *Mus* 20 *musculus* dar, die die Δ24-Reduktase der Sequenz SEQ ID NO. 14 codiert.

Alle vorstehend erwähnten Δ24-Reduktase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 30 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahren werden Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich zu den vorstehend beschriebenen genetischen Veränderungen eine reduzierte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe C24-Methyltransferase-Aktivität und Δ22-Desaturase-Aktivität aufweisen.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich zu den vorstehend beschriebenen genetischen Veränderungen eine redu-

zierte C24-Methyltransferase-Aktivität und eine reduzierte Δ22-Desaturase-Aktivität aufweisen.

Unter einer reduzierten Aktivität wird sowohl die reduzierte als
5 auch das komplette Ausschalten der Aktivität verstanden. Eine Reduzierung einer Aktivität umfasst demnach auch eine mengenmäßige Verringerung des entsprechenden Proteins in dem Organismus bis hin zu einem vollständigen Fehlen des entsprechenden Proteins, beispielsweise zu testen durch eine fehlende Nachweisbarkeit der entsprechenden Enzymaktivität oder eine fehlende immuno-
10 logische Nachweisbarkeit der entsprechenden Proteine.

Unter C24-Methyltransferase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer C24-Methyltransferase verstanden.

15 Unter einer C24-Methyltransferase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Zymosterol in Fecosterol (Ergosta-8,24(28)dienol umzuwandeln.

20 Dementsprechend wird unter C24-Methyltransferase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein C24-Methyltransferase umgesetzte Menge Zymosterol bzw. gebildete Menge Fecosterol verstanden.

25 Bei einer reduzierten C24-Methyltransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein C24-Methyltransferase die umgesetzte Menge Zymosterol bzw. die gebildete Menge Fecosterol reduziert.

30 Vorzugsweise erfolgt diese Reduzierung der C24-Methyltransferase-Aktivität auf mindestens 90%, weiter bevorzugt auf mindestens 70%, weiter bevorzugt auf mindestens 50%, weiter bevorzugt auf mindestens 30%, bevorzugter auf mindestens 10%, noch bevorzugter auf mindestens 5%, insbesondere auf 0% der C24-Methyltransferase-
35 Aktivität des Wildtyps. Besonders bevorzugt ist demnach ein Ausschalten der C24-Methyltransferase-Aktivität im Organismus.

Unter Δ22-Desaturase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Δ22-Desaturase verstanden.

40 Unter einer Δ22-Desaturase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Ergosta-5,7-dienol in Ergosta-5,7,22,24-tetraen-3β-ol umzuwandeln.

20

Dementsprechend wird unter $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein $\Delta 22$ -Desaturase umgesetzte Menge Ergosta-5,7-dienol bzw. gebildete Menge Ergosta-5,7,22,24-te-
traen-3 β -ol verstanden.

5

Bei einer reduzierten $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein $\Delta 22$ -Desaturase die umgesetzte Menge Ergo-
sta-5,7-dienol bzw. die gebildete Menge Ergosta-5,7,22,24-te-
traen-3 β -ol reduziert.

Vorzugsweise erfolgt diese Reduzierung der $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivi-
tät auf mindestens 90%, weiter bevorzugt auf mindestens 70%, wei-
ter bevorzugt auf mindestens 50%, weiter bevorzugt auf mindestens
15 30%, bevorzugter auf mindestens 10%, noch bevorzugter auf minde-
stens 5%, insbesondere auf 0% der $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität des
Wildtyps. Besonders bevorzugt ist demnach ein Ausschalten der
D22-Desaturase-Aktivität im Organismus.

20 Die Reduzierung der C24-Methyltransferase-Aktivität und/oder
 $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität kann unabhängig voneinander durch unter-
schiedliche zellbiologische Mechanismen erfolgen, beispielsweise
durch Inhibition der entsprechenden Aktivität auf Proteinebene,
beispielsweise durch Zugabe von Inhibitoren der entsprechenden
25 Enzyme oder durch Reduzierung der Genexpression der entsprechen-
den Nukleinsäuren, codierend eine C24-Methyltransferase oder
 $\Delta 22$ -Desaturase, gegenüber dem Wildtyp.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Ver-
30 fahrens erfolgt die Reduzierung der C24-Methyltransferase- und/
oder $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine
Reduzierung der Genexpression der entsprechenden Nukleinsäuren,
codierend eine C24-Methyltransferase oder $\Delta 22$ -Desaturase.

35 Die Reduzierung der Genexpression der Nukleinsäuren, codierend
eine C24-Methyltransferase oder $\Delta 22$ -Desaturase, gegenüber dem
Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, bei-
spielsweise durch

40 a) Einbringen von Nukleinsäuresequenzen, welche zu einer anti-
sense-Nukleinsäuresequenz transkribierbar sind, die zur Inhibi-
tion der C24-Methyltransferase-Aktivität und/oder $\Delta 22$ -Desaturase-
Aktivität befähigt ist, beispielsweise indem sie die Expression
von endogener C24-Methyltransferase und/oder $\Delta 22$ -Desaturase-Akti-
45 vität inhibiert,

21

- b) die zu Kosuppression führende Überexpression homologer C24-Methyltransferase- und/oder Δ22-Desaturase-Nukleinsäuresequenzen,
- c) die Einführung von Nonsense-Mutationen in das Endogen mittels
5 Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in den Organismus,
- d) durch das Einbringen von spezifischen DNA-bindenden Faktoren, beispielsweise Faktoren vom Typus der Zinkfingertranskriptionsfaktoren, die eine Reduzierung der Genexpression bewirken oder
10
- e) die Generierung von Knockout-Mutanten, beispielsweise mit Hilfe von T-DNA-Mutagenese oder homologer Rekombination.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Reduzierung der Genexpression der Nukleinsäuren, codierend eine C24-Methyltransferase oder Δ22-Desaturase durch Generierung von Knockout-Mutanten, besonders bevorzugt durch homologe Rekombination.

20 Demnach wird bevorzugt ein Organismus verwendet, der kein funktionelles C24-Methyltransferase- und/oder Δ22-Desaturase-Gen aufweist.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Generierung von Knockout-Mutanten, also die Deletion des Ziellocus C24-Methyltransferase- und/oder Δ22-Desaturase-Gen bei gleichzeitiger Integration einer Expressionskassette, enthaltend mindestens eine der vorstehend oder nachstehend beschriebenen Nukleinsäuren, codierend ein Protein dessen Aktivität im Vergleich zum Wildtyp erhöht 30 wird, durch homologe Rekombination.

Dazu können Nukleinsäurekonstrukte verwendet werden, die neben den nachstehend beschriebenen Expressionskassetten, enthaltend Promotor, kodierende Sequenz und gegebenenfalls Terminator und 35 neben einem nachstehend beschriebenen Selektionsmarker am 3'- und 5'-Ende Nukleinsäuresequenzen enthalten, die mit Nukleinsäuresequenzen am Anfang und am Ende des zu deletierenden Gens identisch sind.

40 Vorzugsweise kann der Selektionsmarker nach der Selektion durch Rekombinase-Systeme wieder entfernt werden, beispielsweise durch loxP-Signale am 3'- und 5'-Ende des Selektionsmarkers unter Verwendung einer Cre-Rekombinase (Cre-LoxP-System).

45 Im bevorzugten Organismus *Saccharomyces cerevisiae* bedeutet das C24-Methyltransferase-Gen das Gen *ERG6* (SEQ. ID. NO. 19). SEQ. ID. NO. 20 stellt die entsprechende C24-Methyltransferase aus

22

Saccharomyces cerevisiae dar (Hardwick, K.G. et al.,: SED6 is identical to ERG6, and encodes a putative methyltransferasere quired for ergosterol synthesis. Yeast. Feb;10(2):265-9).

5 Im bevorzugten Organismus *Saccharomyces cerevisiae* bedeutet das Δ22-Desaturase-Gen das Gen *ERG5* (SEQ. ID. NO. 21). SEQ. ID. NO. 22 stellt die entsprechende Δ22-Desaturase aus *Saccharomyces cerevisiae* dar (Skaggs, B.A. et al.,: Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* C-22 sterol desaturase gene, enco-
10 ding a second cytochrome P-450 involved in ergosterol biosynthe sis, Gene. 1996 Feb;22;169(1):105-9.).

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Organismen kultiviert, die zusätzlich zu den
15 vorstehend beschriebenen Veränderungen gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Lanosterol-C14-De- methylase-Aktivität, Squalenepoxidase-Aktivität, Squalensynthe- tase-Aktivität und Sterol-Acyltransferase-Aktivität aufweisen.

20 Unter HMG-CoA-Reduktase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer HMG-CoA-Reduktase (3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A-Reduktase) verstanden.

25 Unter einer HMG-CoA-Reduktase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl- Coenzym-A in Mevalonat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter HMG-CoA-Reduktase-Aktivität die in
30 einer bestimmten Zeit durch das Protein HMG-CoA-Reduktase umge- setzte Menge 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A bzw. gebildete Menge Mevalonat verstanden.

Bei einer erhöhten HMG-CoA-Reduktase-Aktivität gegenüber dem
35 Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein HMG-CoA-Reduktase die umgesetzte Menge 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A bzw. die gebildete Menge Mevalonat erhöht.

40 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivi- tät mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevor- zugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzug- ter mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, insbeson- dere mindestens 600% der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität des Wild-
45 typs.

Unter Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Lanosterol-C14-Demethylase verstanden.

Unter einer Lanosterol-C14-Demethylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Lanosterol in 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Lanosterol-C14-Demethylase umgesetzte Menge Lanosterol bzw. gebildete Menge 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol verstanden.

Bei einer erhöhten Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Lanosterol-C14-Demethylase die umgesetzte Menge Lanosterol bzw. die gebildete Menge 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugter mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, insbesondere mindestens 600% der Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität des Wildtyps.

25

Unter Squalenepoxidase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Squalenepoxidase verstanden.

Unter einer Squalenepoxidase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Squalen in Squalenepoxid umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Squalenepoxidase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Squalenepoxidase umgesetzte Menge Squalen bzw. gebildete Menge Squalenepoxid verstanden.

Bei einer erhöhten Squalenepoxidase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Squalenepoxidase die umgesetzte Menge Squalen bzw. die gebildete Menge Squalenepoxid erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Squalenepoxidase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugter mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, insbesondere mindestens 600% der Squalenepoxidase-Aktivität des Wildtyps.

Unter Squalensynthetase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Squalensynthetase verstanden.

Unter einer Squalensynthetase wird ein Protein verstanden, das 5 die enzymatische Aktivität aufweist, Farnesylpyrophosphat in Squalen umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Squalensynthetase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Squalensynthetase umge-10 setzte Menge Farnesylpyrophosphat bzw. gebildete Menge Squalen verstanden.

Bei einer erhöhten Squalensynthetase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten 15 Zeit durch das Protein Squalensynthetase die umgesetzte Menge Farnesylpyrophosphat bzw. die gebildete Menge Squalen erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Squalensynthetase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevor-20 zugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugter mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, insbeson-dere mindestens 600% der Squalensynthetase-Aktivität des Wild-typs.

25 Unter Sterol-Acyltransferase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Sterol-Acyltransferase verstanden.

Unter einer Sterol-Acyltransferase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, 7-Dehydrocholesterol in 30 in entsprechendes acetyliertes 7-Dehydrocholesterol umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Sterol-Acyltransferase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Sterol-Acyltransferase umgesetzte Menge 7-Dehydrocholesterol bzw. gebildete Menge acetyl-35 liertes 7-Dehydrocholesterol verstanden.

Bei einer erhöhten Sterol-Acyltransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Sterol-Acyltransferase die umgesetzte 40 Menge 7-Dehydrocholesterol bzw. die gebildete Menge acetyliertes 7-Dehydrocholesterol erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Sterol-Acyltransferase-Aktivität mindestens 5%, weiter bevorzugt mindestens 20%, weiter bevorzugt mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 100%, bevorzugter mindestens 300%, noch bevorzugter mindestens 500%, ins-45

besondere mindestens 600% der Sterol-Acyltransferase-Aktivität des Wildtyps.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der 5 HMG-CoA-Reduktase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsmäßigen Verfahrens erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase indem man ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend eine Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase in den Organismus einbringt, deren Expression in dem Organismus, verglichen mit dem Wildtyp, einer reduzierten Regulation unterliegt.

Unter einer reduzierten Regulation verglichen mit dem Wildtyp, wird eine im Vergleich zum vorstehend definierten Wildtyp verringerte, vorzugsweise keine Regulation auf Expressions- oder Protein-Ebene verstanden.

Die reduzierte Regulation kann vorzugsweise durch einen im Nukleinsäurekonstrukt mit der kodierenden Sequenz funktionell verknüpften Promotor erreicht werden, der in dem Organismus, 25 verglichen mit dem Wildtyp-Promoter einer reduzierten Regulation unterliegt.

Beispielsweise unterliegt der mittlere ADH-Promotor in Hefe nur eine reduzierte Regulation und ist daher insbesondere als Promotor im vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukt bevorzugt.

Dieses Promotorfragment des *ADH12s* Promotors, im folgenden auch *ADH1* bezeichnet, zeigt eine annähernd konstitutive Expression (Ruohonen L, Penttila M, Keranen S. (1991) Optimization of *Bacillus alpha-amylase production by Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. May-Jun; 7(4):337-462; Lang C, Looman AC. (1995) Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol. Dec; 44(1-2):147-56.), so daß die transkriptionelle Regulation 40 nicht mehr über Intermediate der Ergosterolbiosynthese abläuft.

Weitere bevorzugte Promotoren mit reduzierter Regulation sind konstitutive Promotoren wie beispielsweise der TEF1-Promotor aus Hefe, der GPD-Promotor aus Hefe oder der PGK-Promotor aus Hefe 45 (Mumberg D, Muller R, Funk M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. Gene. 1995 Apr 14;156(1):119-22; Chen CY, Oppermann

H, Hitzeman RA. (1984) Homologous versus heterologous gene expression in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. Dec 11;12(23):8951-70.).

- 5 Die reduzierte Regulation kann in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform dadurch erreicht werden, daß man als Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase eine Nukleinsäure verwendet, deren Expression in dem Organismus, verglichen mit der Organismus eigenen, orthologen Nukleinsäure, einer reduzierten Regulation
10 unterliegt.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung einer Nukleinsäure, die nur den katalytischen Bereich der HMG-CoA-Reduktase kodiert (trunkierte (t-)HMG-CoA-Reduktase) als Nukleinsäure, codierend 15 eine HMG-CoA-Reduktase. Diese in EP 486 290 und WO 99/16886 beschriebene Nukleinsäure (t-HMG) kodiert nur den katalytisch aktiven Teil der HMG-CoA-Reduktase, die für die Regulation auf Proteinebene verantwortliche Membran-Domäne fehlt. Diese Nuklein-
säure unterliegt somit, insbesondere in Hefe, einer reduzierten 20 Regulation und führt zu einer Erhöhung der Genexpression der HMG-CoA-Reduktase.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man Nukleinsäuren, vorzugsweise via vorstehend beschriebenes Nuklein-
25 säurekonstrukt, ein, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 24 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 24, und die die enzymatische
30 Eigenschaft einer HMG-CoA-Reduktase aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 24 stellt die Aminosäuresequenz der trunkierten HMG-CoA-Reduktase (t-HMG) dar.

35 Weitere Beispiele für HMG-CoA-Reduktasen und damit auch für die auf den katalytischen Bereich reduzierten t-HMG-CoA-Reduktasen bzw. die kodierenden Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz bekannt ist durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 24 leicht auffinden.
40

Weitere Beispiele für HMG-CoA-Reduktasen und damit auch für die auf den katalytischen Bereich reduzierten t-HMG-CoA-Reduktasen
45 bzw. die kodierenden Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 23 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridi-

sierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

Besonders bevorzugt verwendet man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 23 als Nukleinsäure, kodierend eine trunzierte HMG-CoA-Reduktase.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die reduzierte Regulation dadurch erreicht, daß man als Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase eine Nukleinsäure verwendet, deren Expression in dem Organismus, verglichen mit der Organismus eigenen, orthologen Nukleinsäure, einer reduzierten Regulation unterliegt und einen Promotor verwendet, der in dem Organismus, verglichen mit dem Wildtyp-Promoter einer reduzierten Regulation unterliegt.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase durch Einbringen von einer oder mehrer Nuklein- säuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase in den Organismus.

Dazu kann prinzipiell jedes Lanosterol-C14-Demethylase-Gen (ERG11), also jede Nukleinsäuren die eine Lanosterol-C14-Demethylase codiert, verwendet werden. Bei genomischen Lanosterol-C14-Demethylase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Lanosterol-C14-Demethylase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für Lanosterol-C14-Demethylase-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Kalb VF, Loper JC, Dey CR, Woods CW, Sutter TR (1986) Isolation of a cytochrome P-450 structural gene from *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 45(3):237-45), *Candida albicans* (Lamb DC, Kelly DE, Baldwin BC, Gozzo F, Boscott P, Richards WG, Kelly SL (1997) Differential inhibition of *Candida albicans* CYP51 with azole antifungal stereoisomers. FEMS Microbiol Lett 149(1):25-30), *Homo sapiens* (Stromstedt M, Rozman D, Waterman MR. (1996) The ubiquitously expressed human CYP51 encodes lanosterol

14 alpha-demethylase, a cytochrome P450 whose expression is regulated by oxysterols. Arch Biochem Biophys 1996 May 1;329(1):73-81c) oder *Rattus norvegicus*, Aoyama Y, Funae Y, Noshiro M, Horiuchi T, Yoshida Y. (1994) Occurrence of a P450 showing high homology to yeast lanosterol 14-demethylase (P450(14DM)) in the rat liver. Biochem Biophys Res Commun. Jun 30;201(3):1320-6)

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Lanosterol-C14-Demethylase-Gen vor.

Die Anzahl der Lanosterol-C14-Demethylase-Gene in den erfindungsgemäßen transgenen Organismen beträgt mindestens zwei, vorzugsweise mehr als zwei, besonders bevorzugt mehr als drei, ganz besonders bevorzugt mehr als fünf.

Bevorzugt verwendet man im vorstehend beschriebenen Verfahren Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäure-Sequenz SEQ. ID. NO. 26 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 26, und die die enzymatische Eigenschaft einer Lanosterol-C14-Demethylase aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 26 stellt die Aminosäuresequenz der Lanosterol-C14-Demethylase aus *Saccharomyces cerevisiae* dar.

Weitere Beispiele für Lanosterol-C14-Demethylasen und Lanosterol-C14-Demethylase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz bekannt ist durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 26 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Lanosterol-C14-Demethylasen und Lanosterol-C14-Demethylase-gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 25 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht aufzufinden.

Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 26 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Ver-

gleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 26, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

- 5 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Lanosterol-C14-Demethylase aus *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ. ID. NO. 26).
- 10 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend 15 der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden.

Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

- 20 Soll das Protein beispielsweise in Hefe exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Hefe bei der Rückübersetzung zu verwenden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine 25 Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 25 in den Organismus ein.

- Die Sequenz SEQ. ID. NO. 25 stellt die genomische DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* (ORF S0001049) dar, die die Lanosterol-30 C14-Demethylase der Sequenz SEQ ID NO. 26 codiert.

Alle vorstehend erwähnten Lanosterol-C14-Demethylase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer 40 Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

30

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Squalenepoxidase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Squalenepoxidase.

5

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Squalenepoxidase durch Einbringen von einer oder mehreren Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase in den Organismus.

10

Dazu kann prinzipiell jedes Squalenepoxidase-Gen (ERG1), also jede Nukleinsäuren die eine Squalenepoxidase codiert, verwendet werden. Bei genomischen Squalenepoxidase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den 15 Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Squalenepoxidase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

20 Beispiele für Nukleinsäuren kodierend eine Squalenepoxidase sind Nukleinsäuren, codierend eine Squalenepoxidase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Jandrositz, A., et al (1991) The gene encoding squalene epoxidase from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. Gene 107:155-160, aus *Mus musculus* (Kosuga K, Hata S, 25 Osumi T, Sakakibara J, Ono T. (1995) Nucleotide sequence of a cDNA for mouse squalene epoxidase, Biochim Biophys Acta, Feb 21;1260(3):345-8b), aus *Rattus norvegicus* (Sakakibara J, Watanabe R, Kanai Y, Ono T. (1995) Molecular cloning and expression of rat squalene epoxidase. J Biol Chem Jan 6;270(1):17-20c) oder aus 30 *Homo sapiens* (Nakamura Y, Sakakibara J, Izumi T, Shibata A, Ono T. (1996) Transcriptional regulation of squalene epoxidase by sterols and inhibitors in HeLa cells., J. Biol. Chem. 1996, Apr 5;271(14):8053-6).

35 In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Squalenepoxidase vor.

Die Anzahl der Squalenepoxidase-Gene in den erfindungsgemäßen 40 transgenen Organismen beträgt mindestens zwei, vorzugsweise mehr als zwei, besonders bevorzugt mehr als drei, ganz besonders bevorzugt mehr als fünf.

Bevorzugt verwendet man im vorstehend beschriebenen Verfahren 45 Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 28 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete

31

Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 28, und die die enzymatische Eigen-
5 schaft einer Squalenepoxidase aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 28 stellt die Aminosäuresequenz der Squalenepoxidase aus *Saccharomyces cerevisiae* dar.

10 Weitere Beispiele für Squalenepoxidasen und Squalenepoxidase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz bekannt ist durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nuklein-
säuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 28 leicht auf-
15 finden.

Weitere Beispiele für Squalenepoxidase und Squalenepoxidase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 27 aus verschiedenen Organismen deren genomische
20 Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die
25 Aminosäuresequenz der Squalenepoxidase aus *Saccharomyces cerevisiae*) (SEQ. ID. NO. 28).

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rück-
übersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code er-
30 hältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden.
Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen
35 anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in Hefe exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Hefe bei der Rücküber-
40 setzung zu verwenden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 27 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 27 stellt die genomische DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* (ORF YGR175C) dar, die die Squalenepoxidase der Sequenz SEQ. ID. NO. 28 codiert.

- 5 Alle vorstehend erwähnten Squalenepoxidase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligo-
10 nukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie
15 allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Squalensynthetase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Squalensynthetase.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Squalensynthetase durch Einbringen von einer oder mehreren Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase in den Organismus.

Dazu kann prinzipiell jedes Squalensynthetase-Gen (ERG9), also jede Nukleinsäure die eine Squalensynthetase codiert, verwendet werden. Bei genomischen Squalensynthetase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Squalensynthetase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für Nukleinsäuren kodierend eine Squalensynthetase sind Nukleinsäuren, codierend eine Squalensynthetase aus *Saccharomyces cerevisiae* (ERG9), (Jennings, S.M., (1991): Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase. Proc Natl Acad Sci USA. Jul15;88(14):6038-42), Nukleinsäuren, codierend eine Squalensynthetase aus *Botryococcus braunii* Okada (Devarenne, T.P. et al.: Molecular characterization of squalene synthase from the green microalga *Botryococcus braunii*, raceB, Arch. Biochem. Biophys. 2000, Jan15, 373(2):307-17), Nukleinsäuren, codierend eine Squalensynthetase aus Potato tuber (Yoshioka H. et

al.: cDNA cloning of sesquiter penecyclase and squalene synthase, and expression of the genes in potato tuber infected with Phytophthora infestans, Plant. Cell. Physiol. 1999, Sep;40(9):993-8) oder Nukleinsäuren, codierend eine Squalensynthetase aus Glycyrrhiza glabra (Hayashi, H. et al.: Molecular cloning and characterization of two cDNAs for Glycyrrhiza glabra squalene synthase, Biol. Pharm. Bull. 1999, Sep;22(9):947-50.

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in die-
10 ser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Squalensynthetase-Gen vor.

Die Anzahl der Squalensynthetase-Gene in den erfindungsgemäßen transgenen Organismen beträgt mindestens zwei, vorzugsweise mehr
15 als zwei, besonders bevorzugt mehr als drei, ganz besonders bevorzugt mehr als fünf.

Bevorzugt verwendet man im vorstehend beschriebenen Verfahren Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäure-Sequenz SEQ. ID. NO. 30 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 30, und die die enzymatische Eigenschaft einer Squalensynthetase aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 30 stellt die Aminosäuresequenz der Squalensynthetase (ERG9) aus *Saccharomyces cerevisiae* dar.

30 Weitere Beispiele für Squalensynthetasen und Squalensynthetase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz bekannt ist durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 30 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Squalensynthetase und Squalensynthetase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 29 aus verschiedenen Organismen deren genomicsche Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Squalensynthetase aus *Saccharomyces cerevisiae*) (SEQ. ID. NO. 30).

5

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

10 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

15

Soll das Protein beispielsweise in Hefe exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Hefe bei der Rückübersetzung zu verwenden.

20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 29 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 29 stellt die genomische DNA aus *Sac-
25 charomyces cerevisiae* (ORF YHR190W) dar, die die Squalensynthe-
tase der Sequenz SEQ. ID. NO. 30 codiert.

Alle vorstehend erwähnten Squalensynthetase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Sterol-Acyltransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Ste-
rol-Acyltransferase.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Sterol-Acyltransferase durch Einbringen von einer oder mehreren Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase in den Organismus.

5

Dazu kann prinzipiell jedes Sterol-Acyltransferase-Gen (SAT1 oder SAT2), also jede Nukleinsäuren die eine Sterol-Acyltransferase codiert, verwendet werden. Bei genomicen Sterol-Acyltransferase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die In-
10 trons enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Sterol-Acyltransferase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

15

Beispiele für Nukleinsäuren kodierend eine Sterol-Acyltransferase sind Nukleinsäuren, codierend eine Sterol-Acyltransferase aus *Saccharomyces cerevisiae* (SAT1) oder (SAT2), (Yang, H.: Sterol esterification in yeast: a two-gene process. *Science*. 1996 May 20 31;272(5266):1353-6.), eine weitere Nukleinsäure, codierend eine weitere Sterol-Acyltransferase aus *Saccharomyces cerevisiae* (J. Biol. Chem. 1996, Sep 27;271(39):24157-63), Nukleinsäuren kodierend eine humane Sterol-Acyltransferase (Chang, C.C. et al., Molecular cloning and functional expression of human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster ovary cells, J. Biol. Chem. 1993, Oct 5;268(28):20747-55) und Nukleinsäuren kodierend eine murine Sterol-Acyltransferase (Uelmen, P.J.: Tissue-specific expression and cholesterol regulation of acylcoenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) in mice. Molecular cloning of mouse ACAT cDNA, chromosomal localization, and regulation of ACAT in vivo and in vitro, J. Biol. Chem. 1995 Nov 30 3;270(44):26192-201).

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Sterol-Acyltransferase vor.

Die Anzahl der Sterol-Acyltransferase-Gene in den erfindungsgemäßen transgenen Organismen beträgt mindestens zwei, vorzugsweise 40 mehr als zwei, besonders bevorzugt mehr als drei, ganz besonders bevorzugt mehr als fünf.

Bevorzugt verwendet man im vorstehend beschriebenen Verfahren Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 32 oder SEQ. ID. NO. 50 oder eine von diesen Sequenzen durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens

36

30%, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 32 oder SEQ. ID. NO. 50, und die die enzymatische Eigenschaft einer Sterol-Acyl-
5 transferase aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 32 stellt die Aminosäuresequenz der Sterol-Acyltransferase SAT1 aus *Saccharomyces cerevisiae* dar.

10 Die Sequenz SEQ. ID. NO. 50 stellt die Aminosäuresequenz der Sterol-Acyltransferase SAT2 aus *Saccharomyces cerevisiae* dar.

SAT1 und SAT2 unterscheiden sich durch eine unterschiedliche Substratspezifität.

15 Weitere Beispiele für Sterol-Acyltransferasen und Sterol-Acyl-transferase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz bekannt ist durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rücküber-
20 setzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 32 oder 50 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Sterol-Acyltransferase und Sterol-Acyl-transferase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend
25 von der Sequenz SEQ. ID. No. 31 oder 49 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

30 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Sterol-Acyltransferase SAT1 aus *Saccharomyces cerevisiae*) (SEQ. ID. NO. 32) oder SAT2 aus *Saccharomyces cerevisiae*) (SEQ. ID. NO. 50).

35 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

40 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

45

Soll das Protein beispielsweise in Hefe exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Hefe bei der Rückübersetzung zu verwenden.

- 5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 31 oder 49 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 31 stellt die genomische DNA aus *Sac-
10 charomyces cerevisiae* (ORF YNR019W) dar, die die Sterol-Acyl-
transferase SAT1 der Sequenz SEQ ID NO. 32 codiert.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 49 stellt die genomische DNA aus *Sac-
charomyces cerevisiae* (ORF YCR048W) dar, die die Sterol-Acyl-
15 transferase SAT2 der Sequenz SEQ ID NO. 50 codiert.

Alle vorstehend erwähnten Sterol-Acyltransferase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation 20 einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer 25 Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

30 Unter Organismen werden erfindungsgemäß beispielsweise Bakterien, insbesondere Bakterien der Gattung *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus spec.* oder *Streptomyces spec.*,

35 beispielsweise Hefen, insbesondere Hefen der Gattung *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* oder *Klyveromyces spec.*

beispielsweise Pilze, insbesondere Pilze der Gattung *Aspergillus spec.*, *Penicillium spec.* oder *Dictyostelium spec.*

40 sowie beispielsweise auch Insektenzelllinien verstanden, die in der Lage sind, als Wildtyp oder durch vorherige genetische Veränderung Zymosterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten herzustellen.

Besonders bevorzugte Organismen sind Hefen, insbesondere der Spezies *Saccharomyces cerevisiae*, insbesondere die Hefestämme *Saccharomyces cerevisiae* AH22, *Saccharomyces cerevisiae* GRF, *Saccharomyces cerevisiae* DBY747 und *Saccharomyces cerevisiae* BY4741.

5

Bei Hefen als Organismen oder genetisch veränderten Organismen können zur Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Δ8-Δ7-Isomerase-Aktivität, Δ5-Desaturase-Aktivität und Δ24-Reduktase-Aktivität, wie vortehend erwähnt, die entsprechenden Nukleinsäuren übexprimiert werden.

Die Überexpression kann sowohl homolog durch Einbringen von hefeigenen Nukleinsäuren als auch heterolog durch Einbringen von Nukleinsäuren aus anderen Organismen, insbesondere Säugern, oder davon abgeleitete natürliche oder künstliche Varianten in die Hefe erfolgen. Vorzugsweise werden in Hefen Säugergene verwendet, da diese eine bessere Substratspezifität in Richtung 7-Dehydrocholesterol aufweisen.

20 Die Bestimmung der Δ8-Δ7-Isomerase-Aktivität, Δ5-Desaturase-Aktivität, Δ24-Reduktase-Aktivität, C24-Methyltransferase-Aktivität, Δ22-Desaturase-Aktivität, HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, Squalenepoxidase-Aktivität, Squalensynthetase-Aktivität und Sterol-Acyltransferase-Aktivität des 25 erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismus sowie des Referenzorganismus erfolgt unter folgenden Bedingungen:

Die Bestimmung der Aktivität der HMG-CoA-Reduktase erfolgt wie in Th. Polakowski, Molekularbiologische Beeinflussung des Ergosterolstoffwechsels der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Shaker-Verlag, Aachen 1999, ISBN 3-8265-6211-9, beschrieben.

Demgemäß werden 10^9 Hefe-Zellen einer 48 h alten Kultur durch Zentrifugation (3500xg, 5 min) geerntet und in 2 ml Puffer I (100 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH7,0) gewaschen. Das Zellpellet wird in 500 µl Puffer 1 (cytosolische Proteine) oder 2 (100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH7,0; 1% Triton X-100) (Gesamtproteine) aufgenommen, und es wird 1 µl 500 mM PMSF in Isopropanol zugegeben. Zu den Zellen kommen 500 µl Glasperlen ($d = 0,5$ mm), und die Zellen werden durch 5x eine Minute Vortexen aufgeschlossen. Die Flüssigkeit zwischen den Glasperlen wird in ein neues Eppi überführt. Zellreste bzw. Membranbestandteile werden durch 15 min Zentrifugieren (14000xg) abgetrennt. Der Überstand wird in ein neues Eppi überführt und stellt die Proteinfraktion dar.

45

Die Aktivität der HMG-CoA Aktivität wird durch Messung des Verbrauchs von NADPH+H⁺ bei der Reduktion von 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, das als Substrat zugesetzt wird, bestimmt.

- 5 In einem Testansatz von 1000 µl werden 20 µl Hefeproteinisolat mit
910 µl Puffer I; 50 µl 0,1 M DTT und 10 µl 16 mM NADPH+H⁺ gegeben.
Der Ansatz ist auf 30°C temperiert und wird für 7,5 min bei 340 nm
im Photometer gemessen. Die Abnahme an NADPH, die in diesem Zeit-
raum gemessen wird, ist die Abbaurate ohne Substratzugabe und
10 wird als Hintergrund berücksichtigt.

Danach erfolgt die Zugabe von Substrat (10 µl 30 mM HMG-CoA), und
es werden weitere 7,5 min gemessen. Die Berechnung der HMG-CoA-
Reduktase Aktivität erfolgt durch die Bestimmung der spezifischen
15 NADPH-Abbaurate.

Die Bestimmung der Aktivität der Lanosterol-C14-Demethylase-Akti-
vität erfolgt wie in Omura, T and Sato, R. (1964) The carbon mo-
noxide binding pigment in liver microsomes. J.Biol.Chem. 239,
20 2370-2378, beschrieben. Bei diesem Test ist die Menge an P450-En-
zym als Holoenzym mit gebundenem Häm semi-quantifizierbar. Das
(aktive) Holoenzym (mit Häm) kann durch CO reduziert werden und
nur das CO-reduzierte Enzym weist ein Absorptionsmaximum bei
450 nm auf. So ist das Absorptionsmaximum bei 450 nm ein Maß für
25 die Aktivität der Lanosterol-C14-Demethylase.

Zur Durchführung der Aktivitätsbestimmung wird eine Microsomen-
Fraktion (4-10 mg/ml Protein in 100 mM Kaliumphosphat Puffer) 1:4
verdünnt, so dass die für den Test eingesetzte Protein Konzentra-
30 tion 2 mg/ml beträgt. Der Test wird direkt in einer Küvette
durchgeführt.

Zu den Microsomen wird eine Spatelspitze Dithionite (S₂O₄Na₂) zu-
geben. Mit einem Spektralphotometer wird die Baselinie aufgenom-
35 men im Bereich von 380-500 nm.

Anschliessend werden ca. 20-30 Blasen von CO durch die Probe
gesprudelt. Die Absorption wird nun im selben Bereich gemessen.
Die Höhe der Absorption bei 450 nm entspricht dem Abteil an P450
40 Enzym im Testansatz.

Die Bestimmung der Aktivität der Squalen Epoxidase erfolgt wie in
Leber R, Landl K, Zinser E, Ahorn H, Spok A, Kohlwein SD, Tur-
nowsky F, Daum G. (1998) Dual localization of squalene epoxidase,
45 Erg1p, in yeast reflects a relationship between the endoplasmic

reticulum and lipid particles, Mol. Biol. Cell. 1998,
Feb; 9(2):375-86, beschrieben.

Diese Methode enthält 0,35 bis 0,7 mg microsomales Protein oder
5 3,5 bis 75 µg Lipidpartikel Protein in 100mM Tris-HCl, pH 7,5,
1 mM EDTA, 0,1 mM FAD, 3 mM NADPH, 0,1 mM squalene 2,3-epoxidase
cyclase inhibitor U18666A, 32 µM [³H]Squalen dispergiert in 0,005%
Tween 80 in einem Gesamtvolumen von 500 µl.

10 Der Test wird bei 30°C durchgeführt. Nach einer Vorbehandlung für
10 min, wird die Reaktion durch Zugabe von Squalen gestartet und
nach 15, 30 oder 45 min durch Lipid Extraktion mit 3 ml Chloro-
form/Methanol (2:1 vol/vol) und 750 µl 0,035 % MgCl₂ beendet.

15 Die Lipide werden unter Stickstoff getrocknet und in 0,5 ml Chlo-
roform/Methanol (2:1 vol/vol) rückgelöst. Für eine Dünnschicht
Chromatographie werden Teile auf eine Silica Gel 60 Platte (0,2
mm) gegeben und mit Chloroform als Laufmittel aufgetrennt. Die
Positionen, die [³H]2,3-oxidosqualen und [³H]Squalene enthalten
20 wurden ausgekratzt und mit einem Szintillationzähler quantifi-
ziert.

Die Bestimmung der Aktivität der Δ8-Δ7-Isomerase erfolgt in
leichter Abwandlung wie in Silve S. et al.: Emopamil-binding Pro-
tein, a Mammalian Protein That Binds a Series of Structurally
25 Diverse Neuroprotective Agents, Exhibits 8-7 Sterol Isomerase Ac-
tivity in Yeast. J Biol Chem 1996 Sep 13;271(37):22434-40 be-
schrieben:

30 Aus 10 ml Kulturvolumen aufgearbeitete Microsomen werden für 3 h
in der Anwesenheit von 75 µM Cholesta-8-en-3-ol bei 30 °C inkubiert.
Die Sterole werden anschliessend mit 4 mal 5 ml Hexan ex-
trahiert und aufgereinigt. Aliquots werden mittels GC/MS analy-
siert

35 Die Bestimmung der Aktivität der Δ5-Desaturase erfolgt in leich-
ter Abwandlung wie in Nishi, S. et al. (2000): cDNA cloning of the
mammalian sterol C5-desaturase and the expression in yeast mu-
tant. Biochim.Biophys.Acta1490(1-2), 106-108, beschrieben:

40 Aus 10 ml Kulturvolumen aufgearbeitete Microsomen werden für 3 h
in der Anwesenheit von 75 µM Lathosterol und 2 mM NADH bei 30 °C
inkubiert. Die Sterole werden anschliessend mit 4 mal 5 ml Hexan
extrahiert und aufgereinigt. Aliquots werden mittels GC/MS analy-
45 siert

Die Bestimmung der Aktivität der Δ 24-Reduktase kann wie im folgenden beschrieben durchgeführt werden:

Aus 10 ml Kulturvolumen aufgearbeitete Microsomen werden für 3 h 5 in der Anwesenheit von 75 μ M Cholesta-5,7,24-trienol bei 30 °C inkubiert. Sterole werden anschliessend mit 4 mal 5 ml Hexan extrahiert und aufgereinigt. Aliquots werden mittels GC/MS analysiert.

Die Bestimmung der Aktivität der C24-Methyltransferase kann wie 10 im folgenden beschrieben durchgeführt werden:

Das Protein Erg6p (C24-Methyltransferase) ist zu 80% in Lipidpartikel in der Hefe nachweisbar (Athenstaedt K, Zwey tick D, Jandrositz A, Kohlwein SD, Daum G: Identification and characterization 15 of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1999 Oct;181(20):6441-8). Zur Bestimmung der Enzymaktivität werden Lipidpartikel aus einem Kulturvolumen (48h) von 100 ml aufgearbeitet (nach einer Methode beschrieben bei Athenstaedt K, Zwey tick D, Jandrositz A, Kohlwein SD, Daum G: 20 Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1999 Oct;181(20):6441-8).

Der Proteingehalt wird durch einen Biorad Enzymtest bestimmt und 25 für jeden Testansatz werden 3 mg Protein eingesetzt in einem Volumen von 500 μ l. Dem Testansatz werden 50 μ M [methyl- 3 H]-S-Adenosyl-Methionin und 50 μ M Zymosterol zugesetzt und der Ansatz wird 10 min bei 35°C inkubiert. Anschliessend wird das gleiche Volumen (500 μ l) Chloroform/Methanol (4:1) zugesetzt und anschlie- 30 ßend die Sterole extrahiert.

Mittels Szintillationsmessung kann der Anteil an Zymosterol mit eingebautem [methyl- 3 H]-S-Adenosyl-Methionin bestimmt werden, da durch die Chloroform/Methanol Extraktion nur lipidlösliche Sub- 35 stanzen extrahiert werden. Zur Quantifizierung werden die radioaktiven Zerfälle ebenfalls für 50 μ M [methyl- 3 H]-S-Adenosyl-Methionin mittels Szintillationsmessung bestimmt.

Dieses Verfahren ist eine Abwandlung des in Nes WD, Guo D, Zhou 40 W.: Substrate-based inhibitors of the (S)-adenosyl-L-methionine: Δ 24(25)- to Δ 24(28)-sterol methyl transferase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Arch. Biochem. Biophys.* 1997 Jun 1;342(1):68-81. beschriebenen Verfahrens.

45 Die Bestimmung der Aktivität der Δ 22-Desaturase (ERG5p) kann wie im folgenden beschrieben durchgeführt werden:

Verschiedene Konzentrationen von Ergosta-5,7-dienol, aufgereinigt aus erg5 Mutanten von *S. cerevisiae* (Parks et al, 1985. Yeast sterols. yeast mutants as tools for the study of sterol metabolism. Methods Enzymol. 111:333-346) und 50 µg dilauroylphosphatidylcholin werden gemischt und mit Ultraschall behandelt, bis eine weisse Suspension entsteht. Aufgearbeitete Mikrosomen werden hinzugegeben (1 ml) (3 mg/ml Protein). NADPH (Endkonzentration, 1 mM) wird dem Testansatz zum Start der Enzymreaktion hinzugegeben. Der Ansatz wird 20 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 3 ml Methanol gestoppt und Sterole werden verseift durch Zugabe von 2 ml 60% (wt/vol) KOH in Wasser. Der Ansatz wird bei 90°C for 2 h inkubiert. Der Ansatz wird nach dem Abkühlen dreimal mit 5 ml Hexan extrahiert und durch Rotationsverdampfung eingeengt. Anschliessend werden die Sterole 1h bei 60°C mit bis(Trimethylsilyl)trifluoroacetamid (50 µl in 50 µl Toluol) silyliert. Die Sterole werden durch Gas Chromatographie-Massen Spektroskopie (GC-MS) (beispielsweise Model VG 12-250 gas chromatograph-mass spectrometer; VG Biotech, Manchester, United Kingdom) analysiert. Das entstandene Δ22-desaturierte Intermediat kann abhängig von der eingesetzten Menge an Substrat identifiziert werden. Als Referenz dienen Mikrosomen, die nicht mit Substrat inkubiert werden.

Dieses Verfahren ist eine Abwandlung des in Lamb et al: Purification, reconstitution, and inhibition of cytochrome P-450 sterol delta22-desaturase from the pathogenic fungus *Candida glabrata*. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Jul;43(7):1725-8., beschriebenen Verfahrens.

Die Bestimmung der Aktivität der Squalensynthetase kann wie im folgenden beschrieben durchgeführt werden:

Die Tests enthalten 50 mM Mops, pH 7.2, 10 mM MgCl₂, 1% (v/v) Tween-80, 10% (v/v) 2-propanol, 1 mM DTT, 1 mg/mL BSA, NADPH, FPP (or PSPP) und Mikrosomen (3mg Proteingehalt) in einem Gesamtvolume von 200 µl in Glassröhren. Reaktionen mit radioaktivem Substrat [³H]FPP (15-30 mCi/µmol) werden bei 30 °C für 30 min inkubiert und der Suspensionsansatz mit einem Volumen von 1:1 (v/v) 40% wässriges KOH:Methanol aufgefüllt. Flüssiges NaCl wird zur Sättigung der Lösung hinzugegeben und 2 ml Ligroin enthaltend 0.5% (v/v) Squalen werden ebenfalls zugefügt.

Die Suspension wurde für 30 s gevortext. Je 1 ml der Ligroin Schicht wird in einer Pasteur Pipette auf eine gepackte 0.5 x 6 cm Aluminium Säule (80-200 mesh, Fisher) gegeben. Die Säule ist mit 2 ml Ligroin mit 0.5% (v/v) Squalen präequilibriert. Anschliessend wird die Säule mit 5 x 1 ml Toluol enthaltend 0.5% (v/v) Squalen

eluiert. Die Radioaktivität von Squalen wird in Cytoscint (ICN) Szintillations Cocktail mit einem Szintillationszähler (Beckman) gemessen.

- 5 Dieses Verfahren ist eine Abwandlung der in Radisky et al., Biochemistry. 2000 Feb 22;39(7):1748-60, Zhang et al. (1993) Arch. Biochem. Biophys. 304, 133-143 und Poulter, C. D. et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111, 3734-3739, beschriebenen Verfahren.
- 10 Die Bestimmung der Aktivität der Sterol-Acyltransferase kann wie im folgenden beschrieben durchgeführt werden:
- Aus einer 20 ml Vorkultur, die zwei Tage inkubiert wird, wird eine 200 ml Hauptkultur 1%ig angeimpft und über Nacht in Vollmedium bebrütet. Die Zellen werden geerntet und anschliessend in doppeltem Volumen HP-Puffer (100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4; 15 0,5 mM EDTA; 1 mM Glutathion; 20 µM Leupeptin; 64 µM Benzamidin; 2 mM PMSF) gewaschen und in HP Puffer resuspendiert.
- 20 Nach Zugabe von 1 g Glasperlen werden die Zellen 8 mal eine Minute durch vortexen aufgeschlossen. Der Überstand wird bei 105000 xg ultrazentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml ACAT-Puffer (100 mM Kalium-Phophatpuffer pH7,4; 1 mM Glutathion) aufgenommen.
- 25 Der Enzymtest erfolgt in einem Volumen von 500 µl. Das Substrat Ergosterol wird in 62,5 ml 0,5 x ACAT-Puffer aufgenommen unter heftigem Vortexen. 250 µl dieser Lösung werden als Substrat für den Test eingesetzt. Dazu kommen 20 µl Proteinextrakt, 50 µl Wasser und 130 µl 0,5 x ACAT-Puffer.
- 30 Der Ansatz wird für 15 min bei 37°C inkubiert. Danach werden 50 µl 14C-Oleoyl-CoA (600000 dpm) zugegeben und die Reaktion wird nach einer Minute durch Zugabe von 4 ml Chloroform/Methanol (2:1) gestoppt. Dazu kommen 500 µl H₂O. Zur Phasentrennung wird die Suspension kurz bei 2000 xg zentrifugiert. Die untere Phase wird in einem Spitzkolben bis zur Trockne eingeengt und in 100 µl Chloroform/Methanol (4:1) rückgelöst und auf eine DC-Platte (Kieselgel 35 60 F254) aufgetragen. Die DC wird mit Petroether/Diethylether/Essigsäure 90:10:1 als Laufmittel durchgeführt. Die Flecken der 40 Sterylesterfraktion werden ausgeschnitten und in einem Szintillationszähler die Anzahl der radioaktiven Zerfälle bestimmt. Über die Menge der in Sterylester gebundene 14C-Oleoyl-CoA Moleküle ist die Enzymaktivität bestimmbar.
- 45 In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch

Kultivierung von Organismen, insbesondere von Hefen, die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität, Δ 5-Desaturase-Aktivität und Δ 24-Reduktase-Aktivität aufweisen, zusätzlich eine reduzierte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe C24-Methyltransferase-Aktivität und Δ 22-Desaturase-Aktivität aufweisen und zusätzlich eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte Squaleneoxidase-Aktivität aufweisen.

In weiteren bevorzugten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von Organismen, insbesondere von Hefen, die gegenüber dem Wildtyp

- 10 eine erhöhte Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität aufweisen,
- 20 eine erhöhte Δ 5-Desaturase-Aktivität aufweisen,
- 30 eine erhöhte Δ 24-Reduktase-Aktivität aufweisen,
- 40 eine erhöhte Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität und eine erhöhte Δ 5-Desaturase-Aktivität aufweisen,
- 50 eine erhöhte Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität und eine erhöhte Δ 24-Reduktase-Aktivität aufweisen,
- 60 eine erhöhte Δ 5-Desaturase-Aktivität und eine erhöhte Δ 24-Reduktase-Aktivität aufweisen,
- 70 eine erhöhte Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ 5-Desaturase-Aktivität und eine erhöhte Δ 24-Reduktase-Aktivität aufweisen,
- 80 eine erhöhte Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 90 eine erhöhte Δ 5-Desaturase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 100 eine erhöhte Δ 24-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

45

eine erhöhte $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

5 eine erhöhte $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

10 eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

15 eine erhöhte $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

20 eine erhöhte $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität und eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

25 20 eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

25 eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität und eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

30 eine erhöhte $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

35 eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität und eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

40 eine erhöhte $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität und eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

40 eine erhöhte $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

45

eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

5 eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

10 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

15 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

20 eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

25 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

30 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität aufweisen,

35 eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität aufweisen,

40 eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität aufweisen,

45 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität aufweisen,

50 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität aufweisen,

55 eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität aufweisen,

45 sen,

eine erhöhte $\Delta 8-\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität aufweisen,

5 eine erhöhte $\Delta 8-\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

10 eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

15 eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

20 eine erhöhte $\Delta 8-\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

25 eine erhöhte $\Delta 8-\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

30 eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

35 eine erhöhte $\Delta 8-\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

40 eine erhöhte $\Delta 8-\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

45 eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,

- eine erhöhte $\Delta 8\text{-}\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,
- 5 eine erhöhte $\Delta 8\text{-}\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,
- 10 eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,
- 15 eine erhöhte $\Delta 8\text{-}\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität aufweisen,
- 20 eine erhöhte $\Delta 8\text{-}\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 25 eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 30 eine erhöhte $\Delta 8\text{-}\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 35 eine erhöhte $\Delta 8\text{-}\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 40 eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 45 eine erhöhte $\Delta 8\text{-}\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-

Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

5 eine erhöhte Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität und eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Δ 5-Desaturase-Aktivität und eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität aufweisen,

10 eine erhöhte Δ 24-Reduktase-Aktivität und eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte Δ 5-Desaturase-Aktivität aufweisen,

15 eine erhöhte Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte Δ 24-Reduktase-Aktivität aufweisen,

20 eine erhöhte Δ 5-Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte Δ 24-Reduktase-Aktivität aufweisen,

25 eine erhöhte Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ 5-Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte Δ 24-Reduktase-Aktivität aufweisen,

30 eine erhöhte Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

35 eine erhöhte Δ 5-Desaturase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Δ 24-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

40 eine erhöhte Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ 5-Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

45 eine erhöhte Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ 24-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

50

eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

5 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

10 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität aufweisen,

15 eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität aufweisen,

20 eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität aufweisen,

25 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität aufweisen,

30 eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität aufweisen,

35 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität aufweisen,

40 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

45 eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

51

- eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 5 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 10 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 15 eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 20 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 25 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität aufweisen,
- 30 eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität aufweisen,
- 35 eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität aufweisen,
- 40 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität aufweisen,
- 45 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität aufweisen,

52

eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität aufweisen,

5 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität aufweisen,

10 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

15 eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität aufweisen,

5 eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität aufweisen,

10 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität aufweisen,

15 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität aufweisen,

20 eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität aufweisen,

25 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität aufweisen,

30 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

35 eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

40 eine erhöhte Δ_{24} -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

45 eine erhöhte Δ_8 - Δ_7 -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ_5 -Desaturase-Aktivität, eine reduzierte Δ_{22} -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-

- C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- eine erhöhte $\Delta 8-\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 10 eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- 15 15 eine erhöhte $\Delta 8-\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und
20 eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- eine erhöhte $\Delta 8-\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,
- eine erhöhte $\Delta 8-\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen oder
- 30 35 eine erhöhte $\Delta 8-\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität, eine reduzierte $\Delta 22$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität und eine reduzierte
40 C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen.

In weiteren besonders bevorzugten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von Organismen, insbesondere von Hefen, die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte $\Delta 8-\Delta 7$ -Isomerase-Aktivität, eine erhöhte $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität, eine erhöhte

höhte Δ 24-Reduktase-Aktivität, eine reduzierte Δ 22-Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität aufweisen,

5

eine erhöhte Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ 5-Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Δ 24-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ 5-Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Δ 24-Reduktase-Aktivität, eine reduzierte Δ 22-Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

20 eine erhöhte Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ 5-Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Δ 24-Reduktase-Aktivität, eine reduzierte Δ 22-Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität, eine erhöhte Squalen-

25 synthetase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen.

eine erhöhte Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ 5-Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Δ 24-Reduktase-Aktivität, eine reduzierte Δ 22-Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität, eine erhöhte Sterol-Acyltransferase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen.

35

eine erhöhte Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität, eine erhöhte Δ 5-Desaturase-Aktivität, eine erhöhte Δ 24-Reduktase-Aktivität, eine reduzierte Δ 22-Desaturase-Aktivität, eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität, eine erhöhte Sterol-Acyltransferase-Aktivität und eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität aufweisen.

45 Unter den biosynthetischen Zwischenprodukten des 7-Dehydrocholesterol, werden alle Verbindungen verstanden, die im verwendeten Organismus bei der Biosynthese von 7-Dehydrocholesterol als Zwi-

56

schenprodukte auftreten, vorzugsweise die Verbindungen Mevalonat, Farnesylpyrophosphat, Geraniolpyrophosphat, Squalenepoxid, 4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol, 4,4 Dimethylzymosterol, Squalen, Farnesol, Geraniol, Lanosterol, Zymosterol, Lathosterol, Cholesta-7,24-dienol und Cholesta-5,7,24-trienol.

Unter den biosynthetischen Folgeprodukten des Zymosterols, werden alle Verbindungen verstanden, die sich im verwendeten Organismus biosynthetisch von 7-Dehydrocholesterol ableiten, daß heißt bei 10 denen 7-Dehydrocholesterol als Zwischenprodukt auftritt. Dies können Verbindungen sein, die der verwendete Organismus natürlicherweise aus 7-Dehydrocholesterol herstellt, wie beispielsweise Cholesterol oder Vitamin D₃ in Säugern. Es werden aber auch Verbindungen verstanden, die erst durch Einbringen von Genen und Enzymaktivitäten aus anderen Organismen, zu denen der Ausgangsorganismus kein orthologes Gen aufweist, im Organismus aus 7-Dehydrocholesterol hergestellt werden können.

Beispielsweise können durch Einbringen von Säugergenen in Hefe, 20 Folgeprodukte aus 7-Dehydrocholesterol hergestellt werden, die natürlich nur in Säugern vorkommen:

Durch Einbringen einer humanen oder murinen Nukleinsäure, kodierend eine humane oder murine Δ-7-Reduktase wird die Hefe in die 25 Lage versetzt Cholesterol zu produzieren.

Unter UV-Bestrahlung entsteht aus 7-Dehydrocholesterol über Provitamin D₃ unter Umlagerung Vitamin D₃ (Cholecalciferol).

30 Unter den biosynthetischen Folgeprodukten des 7-Dehydrocholesterols werden daher insbesondere Provitamin D₃, Vitamin D₃ (Cholecalciferol) und/oder Cholesterol verstanden.

Bevorzugte biosynthetische Folgeprodukte sind Provitamin D₃ und 35 insbesondere Vitamin D₃.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Verbindungen können in Biotransformationen, chemischen Reaktionen und zu therapeutischen Zwecken verwendet werden, beispielsweise zur Gewinnung von Vitamin D₃ aus 7-Dehydrocholesterol über UV-Bestrahlung, 40 oder zur Gewinnung von Steroidhormonen über Biotransformation ausgehend von Cholesta-7,24-dienol oder Cholesta-5,7,24-trienol.

Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Organismen, im folgenden auch transgene Orga-

nismen bezeichnet, ein Ernten der Organismen und ein Isolieren von 7-Dehydrocholesterol und/ oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten aus den Organismen angeschlossen.

5 Das Ernten der Organismen erfolgt in an sich bekannter Weise dem jeweiligen Organismus entsprechend. Mikroorganismen, wie Bakterien, Moose, Hefen und Pilze oder Pflanzenzellen, die durch Fermentation in flüssigen Nährmedien kultiviert werden, können beispielsweise durch Zentrifugieren, Dekantieren oder Filtrieren
10 abgetrennt werden.

| Die Isolierung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten aus der geernteten Biomasse erfolgt gemeinsam oder jede Verbindung für sich in an
15 sich bekannter Weise, beispielsweise durch Extraktion und gegebenfalls weiterer chemische oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie.

20 Die Herstellung der transgenen Organismen, insbesondere Hefen kann vorzugsweise durch Transformation der Ausgangsorganismen, insbesondere Hefen, entweder mit einem Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure, ausgewählt aus der
25 Gruppe Nukleinsäuren codierend eine Δ8-Δ7-Isomerase, Nukleinsäuren codierend eine Δ5-Desaturase und Nukleinsäuren codierend eine Δ24-Reduktase die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten, erfolgen. Die Herstellung der trans-
30 genen Organismen erfolgt in dieser Ausführungsform mit einem Nukleinsäurekonstrukt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält das vorstehend beschriebene Nukleinsäurekonstrukt zusätzlich mindestens
35 eine Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase und Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase, die mit
40 einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.

Die Herstellung der transgenen Organismen kann aber auch vorzugsweise durch Transformation der Ausgangsorganismen, insbesondere Hefen, mit mindestens einem Nukleinsäurekonstrukt, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäurekonstrukt enthaltend Nukleinsäuren codie-

rend eine $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase, Nukleinsäurekonstrukt enthaltend Nukleinsäuren codierend eine $\Delta 5$ -Desaturase und Nukleinsäurekonstrukt enthaltend Nukleinsäuren codierend eine $\Delta 24$ -Reduktase und diese jeweils mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten, erfolgen. Die Herstellung der transgenen Organismen erfolgt in dieser Ausführungsform mit einzelnen Nukleinsäurekonstrukten oder einer Kombination von Nukleinsäurekonstrukten.

10

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält die vorstehend beschriebene Kombination von Nukleinsäurekonstrukten zusätzlich mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäurekonstrukt enthaltend Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäurekonstrukt enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, Nukleinsäurekonstrukt enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, Nukleinsäurekonstrukt enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase und Nukleinsäurekonstrukt enthalten Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase, die jeweils mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.

25 Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen, insbesondere in Hefen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

30

Nukleinsäurekonstrukte enthaltend diese Expressionskassette sind beispielsweise Vektoren oder Plasmide.

Dementsprechend betrifft die Erfindung ferner Nukleinsäurekonstrukte, insbesondere als Expressionskassette fungierende Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase, Nukleinsäuren codierend eine $\Delta 5$ -Desaturase und Nukleinsäuren codierend eine $\Delta 24$ -Reduktase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst dieses Nukleinsäurekonstrukt zusätzlich mindestens eine Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, Nukleinsäuren co-

dierend eine Squalensynthetase und Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.

5

Alternativ können die erfindungsgemäßen transgenen Organismen auch durch Transformation mit einzelnen Nukleinsäurekonstrukten oder einer Kombination aus Nukleinsäurekonstrukten hergestellt werden, wobei die Kombination

10

mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt, ausgewählt aus der Gruppe A bis C

15 A Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,

20 B Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine $\Delta 5$ -Desaturase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten und

25

C Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine $\Delta 24$ -Reduktase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,

30

und mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt, ausgewählt aus der Gruppe D bis H

35

D Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,

40

E Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,

45

60

- F Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,
5
- G Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,
10
- H Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten
15
- umfasst.

20 Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Organismen, insbesondere in Hefen gewährleisten.

Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also
25 regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende einen Terminator und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind.
30

Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle
35 Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, gegebenenfalls Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

40 Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Plasmide für Hefen und Pilze und Verfahren zur Herstellung von transgenen Hefen, sowie die transgenen Hefen selbst beschrieben.

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Organismen, insbesondere in Hefen steuern kann.

- 5 Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen Promotor, der in der Hefe einer reduzierten Regulation unterliegt, wie beispielsweise der mittlere ADH-Promotor.

Dieses Promotorfragment des *ADH12s* Promotors, im folgenden auch 10 *ADH1* bezeichnet, zeigt eine annähernd konstitutive Expression (Ruohonen L, Penttila M, Keranen S. (1991) Optimization of *Bacillus alpha-amylase* production by *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. May-Jun; 7(4):337-462; Lang C, Looman AC. (1995) Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturo- 15 nase in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol. Dec; 44(1-2):147-56.), so daß die transkriptionelle Regulation nicht mehr über Intermediate der Ergosterolbiosynthese abläuft.

Weitere bevorzugte Promotoren mit reduzierter Regulation sind 20 konstitutive Promotoren wie beispielsweise der TEF1-Promotor aus Hefe, der GPD-Promotor aus Hefe oder der PGK-Promotor aus Hefe (Mumberg D, Muller R, Funk M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. Gene. 1995 Apr 14; 156(1):119-22; Chen CY, Oppermann 25 H, Hitzeman RA. (1984) Homologous versus heterologous gene expression in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. Dec 11; 12(23):8951-70.).

Die Expressionskassette kann auch induzierbare Promotoren, insbesondere chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die 30 Expression der Nukleinsäuren kodierend eine $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase, $\Delta 5$ -Desaturase, $\Delta 24$ -Reduktase, HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squaleneepoxidase, Squalensynthetase oder Sterol-Acyltransferase im Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt ge- 35 steuert werden kann.

Derartige Promotoren wie beispielsweise der CupI-Promotor aus Hefe (Etcheverry T. (1990) Induced expression using yeast copper metallothionein promoter. Methods Enzymol. 1990; 185:319-29.), der 40 Gall-10-Promotor aus Hefe (Ronicke V, Graulich W, Mumberg D, Muller R, Funk M. (1997) Use of conditional promoters for expression of heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, Methods Enzymol. 283:313-22) oder der Pho5-Promotor aus Hefe (Bajwa W, Rudolph H, Hinnen A. (1987) PHO5 upstream sequences confer phospho- 45 phate control on the constitutive PHO3 gene. Yeast. 1987 Mar; 3(1):33-42) können beispielsweise benutzt werden.

Als Terminator der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Terminator geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Organismen, insbesondere in Hefen steuern kann.

5 Bevorzugt ist der Tryptophan-Terminator aus Hefe (TRP1-Terminator).

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren kodierend eine Δ 8- Δ 7-Isomerase, Δ 5-Desaturase, Δ 24-Reduktase, HMG-CoA-Reduktase, Lanosterol-C14-Demethylase, Squalenepoxidase, Squalensynthetase oder Sterol-Acyltransferase und gegebenenfalls einem Terminator nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in 10 T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. 15 et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, 25 sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Hefen bevorzugt werden. Diese von Hefen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Hefespezies exprimiert werden.

35 Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente 40 Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Poly-linker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat 45 der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb

der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zum Wirtsorganismus sein. Die Expressionskassette beinhaltet vor-
5 zugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

10 Ferner können Manipulationen, die passende Restriktions-
schnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder
Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo
Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen
und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese,
15 "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-
back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können
komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung
20 gestellt werden.

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der vorstehend
beschriebenen Nukleinsäuren, der vorstehend beschriebenen
Nukleinsäurekonstrukte oder der vorstehend besschriebenen Pro-
25 teine zur Herstellung von transgenen Organismen, insbesondere
Hefen.

Vorzugsweise weisen diese transgenen Organismen, insbesondere
Hefen gegenüber dem Wildtyp einen erhöhten Gehalt an 7-Dehydro-
30 cholesterol und /oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder
Folgeprodukten auf.

Daher betrifft die Erfindung ferner die Verwendung der vorstehend
beschriebenen Nukleinsäuren oder der erfindungsgemäßen Nuklein-
35 säurekonstrukte zur Erhöhung des Gehalts an 7-Dehydrocholesterol
und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeproduk-
ten in Organismen.

Die vorstehend beschriebenen Proteine und Nukleinsäuren können
40 zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen bio-
synthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten in transgenen
Organismen verwendet werden.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom eines Organismus,
45 insbesondere von Hefe wird als Transformation bezeichnet.

Dazu können insbesondere bei Hefen an sich bekannte Methoden zur Transformation genutzt werden.

- Geeignete Methoden zur Transformation von Hefen sind beispielsweise die LiAC-Methode, wie in Schiestl RH, Gietz RD. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier, Curr Genet. Dec;16 (5-6):339-46, beschrieben, die Elektroporation wie in Manivasakam P, Schiestl RH. (1993) High efficiency transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. Nucleic Acids Res. Sep 11;21(18):4414-5, beschrieben oder die Protoplasierung, wie in Morgan AJ. (1983) Yeast strain improvement by protoplast fusion and transformation, Experientia Suppl. 46:155-66 beschrieben.
- 15 Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor, insbesondere in Plasmide kloniert, die geeignet sind, Hefen zu transformieren, wie beispielsweise die Vektorsysteme Yep24 (Naumovski L, Friedberg EC (1982) Molecular cloning of eucaryotic genes required for excision repair of UV-irradiated DNA: isolation and partial characterization of the RAD3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol Oct;152(1):323-31), Yep13 (Broach JR, Strathern JN, Hicks JB. (1979) Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the CAN1 gene. Gene. 1979 Dec;8(1):121-33), die pRS-Serie von Vektoren (Centromer und Episomal) (Sikorski RS, Hieter P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. May;122(1):19-27) sowie die Vektorsysteme YCp19 oder pYEXBX.
- 20 30 Dementsprechend betrifft die Erfindung weiterhin Vektoren, insbesondere Plasmide enthaltend die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, Nukleinsäurekonstrukte oder Expressionskassetten.
- Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von 35 genetisch veränderten Organismen, indem man eine vorstehend beschriebene Nukleinsäure oder ein vorstehend beschriebenes Nukleinsäurekonstrukt in den Ausgangsorganismus funktionell einführt.
- 40 45 Die Erfindung betrifft ferner die genetisch veränderten Organismen, wobei die genetische Veränderung mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Δ8-Δ7-Isomerase-Aktivität, Δ5-Desaturase-Aktivität und Δ24-Reduktase-Aktivität gegenüber einem Wildtyp erhöht.

Vorzugsweise erfolgt die Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten durch eine Erhöhung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase, Nukleinsäuren codierend eine $\Delta 5$ -Desaturase 5 und Nukleinsäuren codierend eine $\Delta 24$ -Reduktase.

Vorzugsweise erfolgt die Erhöhung der Genexpression der vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren durch Erhöhung der Kopienzahl der Nukleinsäuren codierend eine $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase, codierend eine 10 $\Delta 5$ -Desaturase und/oder codierend eine $\Delta 24$ -Reduktase im Organismus.

Dementsprechend betrifft die Erfindung bevorzugt einen vorstehend beschriebenen genetisch verändertern Organismus der zwei oder 15 mehr Nukleinsäuren codierend eine $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine $\Delta 5$ -Desaturase und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine $\Delta 24$ -Reduktase enthält.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform weist der genetisch veränderte Organismus gegenüber dem Wildtyp zusätzlich zu den vorstehend beschriebenen genetischen Veränderungen eine reduzierte Aktivität mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe C24-Methyltransferase-Aktivität und Delta22-Desaturase-25 Aktivität auf.

Die Reduzierung mindestens einer der Aktivitäten wird vorzugsweise durch eine Reduzierung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend 30 eine C24-Methyltransferase und Nukleinsäuren codierend eine Delta22-Desaturase, gegenüber dem Wildtyp bewirkt.

Ein besonders bevorzugter genetisch veränderter Organismus weist zusätzlich zu den vorstehend beschriebenen genetischen Veränderungen 35 kein funktionelles C24-Methyltransferase-Gen und/oder Delta22-Desaturase-Gen auf.

Besonders bevorzugt sind vorstehend erwähnte, genetisch veränderte Organismen bei denen die genetische Veränderung zusätzlich 40 mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, Squalenepoxidase-Aktivität, Squalensynthetase-Aktivität und Sterol-Acyltransferase-Aktivität, gegenüber einem Wildtyp erhöht.

45 Vorzugsweise erfolgt die Erhöhung mindestens einer dieser Aktivitäten, wie vorstehend erwähnt, durch eine Erhöhung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe

66

Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase-Aktivität,
Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, Nuklein-
säuren codierend eine Squalenepoxidase, Nukleinsäuren codierend
eine Squalensynthetase und Nukleinsäuren codierend eine Sterol-
5 Acyltransferase, gegenüber dem Wildtyp.

Vorzugsweise erfolgt die Erhöhung der Genexpression mindestens
einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren co-
dierend eine HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäuren codierend
10 eine Lanosterol-C14-Demethylase, Nukleinsäuren codierend eine
Squalenepoxidase, Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase
und Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase gegenüber
dem Wildtyp durch Erhöhung der Kopienzahl mindestens einer
Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend
15 eine HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäuren codierend eine
Lanosterol-C14-Demethylase, Nukleinsäuren codierend eine Squalen-
epoxidase, Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase und
Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase im Organis-
mus.

20 Dementsprechend betrifft die Erfindung bevorzugt einen vorstehend
beschriebenen genetisch veränderten Organismus der zwei oder
mehr Nukleinsäuren mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus
der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase-Aktivi-
25 tät, Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase,
Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, Nukleinsäuren co-
dierend eine Squalensynthetase und Nukleinsäuren codierend eine
Sterol-Acyltransferase enthält.

30 Insbesondere betrifft die Erfindung bevorzugt einen genetisch
veränderten Organismus, der zusätzlich zu den vorstehend be-
schriebenen genetischen Veränderungen zwei oder mehr Nukleinsäu-
ren codierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder zwei oder mehr
Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase und/oder
35 zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase und/
oder zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine Squalensyntheta-
se und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine Sterol-
Acyltransferase enthält.

40 Die vorstehend beschriebenen genetisch veränderten Organismen
weisen gegenüber dem Wildtyp einen erhöhten Gehalt an 7-Dehydro-
cholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder
Folgeprodukten auf.

45 Dementsprechend betrifft die Erfindung einen vorstehend beschrie-
benen genetisch veränderten Organismus, dadurch gekennzeichnet,
daß der genetisch veränderte Organismus gegenüber dem Wildtyp ei-

nen erhöhten Gehalt an 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten aufweist.

Bevorzugte, genetisch veränderte Organismen sind erfindungsgemäß 5 genetisch veränderte Hefen oder Pilze, insbesondere erfindungsgemäß genetisch veränderte Hefen, insbesondere die erfindungsgemäß genetisch veränderte Hefespezies *Saccharomyces cerevisiae*, insbesondere die genetisch veränderten Hefestämme *Saccharomyces cerevisiae* AH22, *Saccharomyces cerevisiae* GRF, *Saccharomyces cerevisiae* DBY747 und *Saccharomyces cerevisiae* BY4741.

Erhöhung des Gehaltes an 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen und/oder Folgeprodukten bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung vorzugsweise die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung mindestens einer dieser, vorstehend erwähnten Verbindungen in dem genetisch veränderten Organismus gegenüber dem nicht genetisch veränderten Organismus.

20 Unter Wildtyp wird dementsprechend, wie eingangs erwähnt, vorzugsweise der genetisch nicht veränderte Organismus, insbesondere aber der vorstehend erwähnte Referenzorganismus verstanden.

Unter einem erhöhten Gehalt an 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen und/oder Folgeprodukten im Vergleich zum Wildtyp wird insbesondere die Erhöhung des Gehaltes mindestens einer der vorstehend erwähnten Verbindungen im Organismus um mindestens 50%, vorzugsweise 100%, bevorzugter 200%, besonders bevorzugt 400% im Vergleich zum Wildtyp verstanden.

30 Die Bestimmung des Gehalts an mindestens einer der erwähnten Verbindungen erfolgt vorzugsweise nach an sich bekannten analytischen Methoden und bezieht sich vorzugsweise auf die Kompartimente des Organismus in denen Sterole produziert werden.

35 Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

I. Allgemeine experimentelle Bedingungen

40 1. Restriktion
Die Restriktion der Plasmide (1 bis 10 µg) wurde in 30 µl Ansätzen durchgeführt. Dazu wurde die DNA in 24 µl H₂O aufgenommen, mit 3 µl des entsprechenden Puffers, 1 ml RSA (Rinderserumalbumin) und 45 2 µl Enzym versetzt. Die Enzymkonzentration betrug 1 Unit/µl oder 5 Units/µl je nach DNA Menge. In einigen Fällen wurde dem Ansatz noch 1 µl RNase zugegeben, um die tRNA abzubauen. Der Restrik-

tionsansatz wurde für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Kontrolliert wurde die Restriktion mit einem Minigel.

2. Gelelektrophoresen

5 Die Gelelektrophoresen wurden in Minigel- oder Wide-Minigelapparaturen durchgeführt. Die Minigels (ca. 20 ml, 8 Taschen) und die Wide-Minigels (50 ml, 15 oder 30 Taschen) bestanden aus 1%iger Agarose in TAE. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet. Die Proben (10 µl) wurden mit 3 µl Stopperlösung versetzt und aufgetragen. Als Standard diente I-DNA geschnitten mit *Hind*III (Banden bei: 23,1 kb; 9,4 kb; 6,6 kb; 4,4 kb; 2,3 kb; 2,0 kb; 0,6 kb). Zur Auftrennung wurde eine Spannung von 80 V für 45 bis 60 min angelegt. Danach wurde das Gel in Ethidiumbromidlösung angefärbt und unter UV-Licht mit dem Video-Dokumentationssystem INTAS festgehalten oder mit einem Orange-Filter fotografiert.

3. Gelelution

Mittels Gelelution wurden die gewünschten Fragmente isoliert. Der Restriktionsansatz wurde auf mehrere Taschen eines Minigels aufgetragen und aufgetrennt. Nur λ -*Hind*III und eine "Opferspur" wurden in Ethidiumbromidlösung angefärbt, unter UV-Licht betrachtet und das gewünschte Fragment markiert. Dadurch wurde verhindert, daß die DNA der restlichen Taschen durch das Ethidiumbromid und das UV-Licht geschädigt wird. Durch Aneinanderlegen des gefärbten und ungefärbten Gelstücks konnte anhand der Markierung das gewünschte Fragment aus dem ungefärbten Gelstück herausgeschnitten werden. Das Agarosestück mit dem zu isolierenden Fragment wurde in einen Dialyseschlauch gegeben, mit wenig TAE-Puffer luftblasenfrei verschlossen und in die BioRad-Minigelapparatur gelegt. Der Laufpuffer bestand aus 1 x TAE und die Spannung betrug 100 V für 40 min. Danach wurde für 2 min die Strompolarität gewechselt, um am Dialyseschlauch klebende DNA wieder zu lösen. Der die DNA-Fragmente enthaltende Puffer des Dialyseschlauches wurde in Reaktionsgefäß überführt und damit eine Ethanol Fallung durchgeführt. Dazu wurde der DNA-Lösung 1/10 Volumen an 3 M Natriumacetat, tRNA (1 µl pro 50 µl Lösung) und dem 2,5 fachen Volumen an eiskaltem 96%igem Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei -20°C inkubiert und dann bei 12000 rpm, 30 min, 4°C abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 10 bis 50 µl H₂O (je nach DNA-Menge) aufgenommen.

4. Klenow-Behandlung

Durch die Klenow-Behandlung werden überstehende Enden von DNA Fragmenten aufgefüllt, so daß "blunt-ends" entstehen. Pro 1 µg DNA wurde folgender Ansatz zusammenpipettiert:

DNA-Pellet + 11 µl	H ₂ O
+ 1,5 µl	10 x Klenow Puffer
+ 1 µl	0,1 M DTT
+ 1 µl	Nucleotide (dNTP 2 mM)
5 25	+ 1 µl Klenow-Polymerase (1 Unit/µl)

Die DNA sollte dabei aus einer Ethanolfällung stammen, um zu verhindern, daß Verunreinigungen die Klenow-Polymerase hemmen. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C, durch weitere 5 min bei **10** 70 °C wurde die Reaktion abgestoppt. Die DNA wurde aus dem Ansatz durch eine Ethanolfällung gewonnen und in 10 µl H₂O aufgenommen.

5. Ligation

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden vereinigt. Das Endvolumen **15** von 13,1 µl enthielt ca. 0,5 µl DNA mit einem Vektor-Insert Verhältnis von 1:5. Die Probe wurde 45 Sekunden bei 70 °C inkubiert, auf Raumtemperatur abgekühlt (ca. 3 min) und dann 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Ligationspuffer zugegeben: 2,6 µl 500 mM TrisHCl pH 7,5 und 1,3 µl 100 mM MgCl₂ und weitere 10 min **20** auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 1 µl 500 mM DTT und 1 µl 10 mM ATP und nochmaligen 10 min auf Eis wurde 1 µl Ligase (1 Unit/pl) zugegeben. Die ganze Behandlung sollte möglichst erschütterungsfrei erfolgen, um aneinanderliegende DNA-Enden nicht wieder zu trennen. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 14 °C.

25

6.E. coli-Transformation

Kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) NM522 Zellen wurden mit der DNA des Ligationsansatzes transformiert. Als Positiv-Kontrolle lief ein Ansatz mit 50 µg des pScL3 Plasmids und als Null-Kontrolle ein Ansatz ohne DNA mit. Für jeden Transformationsansatz **30** wurden 100 µl 8% PEG-Lösung, 10 µl DNA und 200 µl kompetente Zellen (*E. coli* NM522) in ein Tischzentrifugenröhren pipettiert. Die Ansätze wurden für 30 min in Eis gestellt und gelegentlich geschüttelt.

35

Danach erfolgte der Hitzeschock: 1 min bei 42 °C. Für die Regeneration wurde den Zellen 1 ml LB-Medium zugegeben und für 90 min bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Je 100 µl der unverdünnten Ansätze, einer 1:10 Verdünnung und einer 1:100 Verdünnung **40** wurden auf LB + Ampicillin-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

7. Plasmid-Isolation aus *E. coli* (Minipräp)

E. coli-Kolonien wurden über Nacht in 1,5 ml LB + Ampicillin-**45** Medium in Tischzentrifugenröhren bei 37 °C und 120 rpm angezogen. Am nächsten Tag wurden die Zellen 5 min bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

70

Jeder Ansatz wurde mit 100 µl 0,2 N NaOH, 1 % SDS-Lösung versetzt, gemischt und für 5 min auf Eis gestellt (Lyse der Zellen). Danach wurden 400 µl Na-Acetat/NaCl-Lösung (230 µl H₂O, 130 µl 3 M Natriumacetat, 40 µl 5M NaCl) zugegeben, der Ansatz gemischt und für weitere 15 min auf Eis gestellt (Proteinfällung). Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 11000 rpm wurde der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, in ein Eppendorfgefäß überführt. War der Überstand nicht vollständig klar, wurde nochmal zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 360 µl eisgekühltem Isopropanol versetzt und für 30 min bei -20 °C inkubiert (DNA-Fällung). Die DNA wurde abzentrifugiert (15 min, 12000 rpm, 4 °C), der Überstand verworfen, das Pellet in 100 µl eisgekühltem 96%igem Ethanol gewaschen, 15 min bei -20 °C inkubiert und erneut abzentrifugiert (15 min, 12000 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde im Speed Vac getrocknet und dann in 100 µl H₂O aufgenommen. Die Plasmid DNA wurde durch Restriktionsanalyse charakterisiert. Dazu wurden 10 µl jedes Ansatzes restringiert und in einem Wide-Minigel gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe oben).

20 8. Plasmid-Aufarbeitung aus E. coli (Maxipräp)

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu isolieren, wurde die Maxipräp Methode durchgeführt. Zwei Kolben mit 100 ml LB + Ampicillin-Medium wurden mit einer Kolonie bzw. mit 100 µl einer Gefrierkulatur, die das zu isolierende Plasmid trägt, angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 120 rpm bebrütet. Die Anzucht (200 ml) wurde am nächsten Tag in einen GSA-Becher überführt und bei 4000 rpm (2600 x g) 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 6 ml TE-Puffer aufgenommen. Zum Abbau der Zellwand wurden 1,2 ml Lysozym-Lösung (20 mg/ml TE-Puffer) zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen mit 12 ml 0,2 N NaOH, 1 % SDS Lösung und weiteren 5 min Inkubation bei Raumtemperatur. Die Proteine wurden durch die Zugabe von 9 ml gekühlter 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und einer 15 minutigen Inkubation auf Eis gefällt. Nach der Zentrifugation (GSA: 13000 rpm (27500 x g), 20 min, 4 °C) wurde der Überstand, der die DNA enthielt, in einen neuen GSA-Becher überführt und die DNA mit 15 ml eiskaltem Isopropanol und einer Inkubation von 30 min bei -20 °C gefällt. Das DNA-Pellet wurde in 5 ml eisgekühltem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet (ca. 30 - 60 min). Danach wurde es in 1 ml H₂O aufgenommen. Es fand eine Überprüfung des Plasmids durch Restriktionsanalyse statt. Die Konzentration wurde durch Auftragen von Verdünnungen auf einem Minigel bestimmt. Zur Verringerung des Salzgehaltes erfolgte eine 30 - 60 minutige Mikrodialyse (Porengröße 0,025 µm).

9. Hefe-Transformation

Für die Hefe-Transformation wurde eine Voranzucht des Stammes *Saccharomyces cerevisiae* AH22 angesetzt. Ein Kolben mit 20 ml YE-Medium wurde mit 100 µl der Gefrierkultur angeimpft und über 5 Nacht bei 28 °C und 120 rpm bebrütet. Die Hauptanzucht erfolgte unter gleichen Bedingungen in Kolben mit 100 ml YE-Medium, die mit 10 µl, 20 µl oder 50 µl der Voranzucht angeimpft wurden.

9.1 Erstellen kompetenter Zellen

10 Am nächsten Tag wurden die Kolben mittels Thomakammer ausgezählt und es wurde mit dem Kolben, der eine Zellzahl von 3 - 5 x 10⁷ Zellen/ml besaß weitergearbeitet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (GSA: 5000 rpm (4000 x g) 10 min) geerntet. Das Zellpellet wurde in 10 ml TE-Puffer aufgenommen und auf zwei Tischzentrifugenröhren aufgeteilt (je 5 ml). Die Zellen wurden 3 min bei 6000 rpm abzentrifugiert und noch zweimal mit je 5 ml TE-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 330 µl Lithiumacetat-Puffer pro 10⁹ Zellen aufgenommen, in einen sterilen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt und eine Stunde bei 28 °C geschüttelt. Dadurch waren die Zellen kompetent für die Transformation.

9.2 Transformation

Für jeden Transformationsansatz wurden 15 µl Heringssperma DNA (10 mg/ml), 10 µl zu transformierende DNA (ca. 0,5 µg) und 330 µl kompetente Zellen in ein Tischzentrifugenrohrchen pipettiert und 30 min bei 28 °C (ohne Schütteln) inkubiert. Danach wurden 700 µl 50% PEG 6000 zugegeben und für eine weitere Stunde bei 28 °C, ohne Schütteln, inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 5 min bei 30 42 °C.
100 µl der Suspension wurden auf Selektionsmedium (YNB, Difco) ausplattiert, um auf Leucinprototrophie zu selektionieren. Im Falle der Selektion auf G418 Resistenz wird nach dem Hitzeschock eine Regeneration der Zellen durchgeführt (s. unter 9.3 Regeneration phase)

9.3 Regenerationsphase

Da der Selektionsmarker die Resistenz gegen G418 ist, brauchten die Zellen Zeit für die Expression des Resistenz-Gens. Die Transformationsansätze wurden mit 4 ml YE-Medium versetzt und über Nacht bei 28 °C auf dem Schüttler (120 rpm) bebrütet. Am nächsten Tag wurden die Zellen abzentrifugiert (6000 rpm, 3 min) in 1 ml YE-Medium aufgenommen und davon 100 µl bzw. 200 µl auf YE + G418-Platten ausplattiert. Die Platten wurden mehrere Tage bei 28 45 °C bebrütet.

10. Reaktionsbedingungen für die PCR

Die Reaktionsbedingungen für die Polymerase Chain Reaction müssen für den Einzelfall optimiert werden und sind nicht uneingeschränkt für jeden Ansatz gültig. So kann unter anderem die eingesetzte Menge an DNA, die Salzkonzentrationen und die Schmelztemperatur variiert werden. Für unsere Problemstellung erwies es sich als günstig, in einem Eppendorfhüttchen, das für den Einsatz im Thermocycler geeignet war, folgende Substanzen zu vereinigen:
Zu 2 µl (= 0,1 U) Super Taq Polymerase wurden 5 µl Super Buffer,
10 8 µl dNTP's (je 0,625 µM), 5'-Primer, 3'-Primer und 0,2 µg Matritzen DNA, gelöst in soviel Wasser, daß sich ein Gesamtvolumen von 50 µl für den PCR Ansatz ergibt, zugegeben. Der Ansatz wurde kurz abzentrifugiert und mit einem Tropfen Öl überschichtet. Es wurden zwischen 37 und 40 Zyklen zur Amplifizierung gewählt.

15

II. Beispiele

Beispiel 1

Expression und Überexpression einer trunkierten HMG-CoA-Reduktase, einer Squalenepoxidase (ERG1) und/oder einer Lanosterol-C14-Demethylase (ERG11) teilweise unter Deletion von ERG5 und ERG6 in *S.cerevisiae* GRF18 bzw. GRFura3

1.1 Herstellung der Plasmide pFlat1 und pFlat3 und pFlat4

25

Zur Herstellung des Expressionsvektors pFlat3 wurde das Plasmid YEp24 (Naumovski L, Friedberg EC (1982) Molecular cloning of eucaryotic genes required for excision repair of UV-irradiated DNA: isolation and partial characterization of the RAD3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol Oct;152(1):323-31) linearisiert durch Restriktion mit *Sph*I und ein 900 bp *Sph*I Fragment aus dem Vektor pPT2B (Lang C, Looman AC. (1995) Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol. Dec; 35 44(1-2): 147-56), welches den *ADH1* Promotor und den *TRP1* Terminator der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und eine Multiple-cloning-site aus dem Vektor pUC19 (Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene. 40 1985;33(1): 103-19.) enthält, integriert.

Die Multiple-cloning-site wurde durch einen Polylinker erweitert, der die Restriktionsstellen *Not*I und *Xho*I enthält. Der Polylinker wurde über die *Sal*I Schnittstelle des Vektors integriert. Das resultierende Plasmid heißt pFlat1.

- Zur Herstellung des Vektors pFlat3 wurde der Vektor pFlat1 durch das Enzym NcoI linearisiert und mittels Klenow-Behandlung blund end gemacht. Anschliessend wurde aus dem Plasmid YDpL (Berben, G., Dumont, J., Gilliquet, V., Bolle, P.A. and Hilger F. (1991) 5 The YDp Plasmids: a Uniform Set of Vectors Bearing Versatile Disruption Cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 7: 475-477.) ein mittels Klenow-Polymerase-Behandlung blund end gemacht BamHI-Fragment, welches das LEU2 Gen der Hefe enthält, integriert.
- 10 Zur Herstellung des Vektors pFlat4 wurde der Vektor pFlat1 durch das Enzym NcoI linearisiert und mittels Klenow-Behandlung blund end gemacht. Anschliessend wurde aus dem Plasmid YDpH (Berben et al., 1991) ein mittels Klenow-Polymerase-Behandlung blund end gemacht BamHI-Fragment, welches das HIS3 Gen der Hefe enthält, integriert.
- 15 1.2 Integration von *ERG1*, *ERG11*, *ERG4*, *ERG2* oder *ERG3* oder dem Gen der Δ24-Reduktase in die Vektoren pFLat1, pFLat3 und pFLat4
- 20 20 Zunächst wurde mittels PCR auf der 5' codierenden Seite der Gene *ERG1*, *ERG11*, *ERG4*, Delta24-Reduktase, *ERG2* oder *ERG3* eine NotI Restriktionsschnittstelle und auf der 3' codierenden Seite der Gene eine XhoI Restriktionsschnittstelle eingefügt und die entsprechenden codierenden Bereiche amplifiziert. Anschliessend wurden die Amplifikate mit den Restriktionsenzymen NotI und XhoI behandelt. Parallel wurden die Plasmide pFLat1, pFLat3 und pFLat4 mit den Enzymen NotI und XhoI behandelt. Durch Ligation mit der T4-Ligase wurden daraufhin die geschnittenen Amplifikate in die 25 geschnittenen Plasmide integriert. Abbildung 7 zeigt beispielweise das Plasmid pFLAT-3-*ERG4*.
- 30 Primer-Sequenzen für die Klonierung von *ERG1*, *ERG11*, *ERG2*, *ERG3*, *ERG4*, Delta24-Reduktase:
- 35 35 Primer ERG1-5' (SEQ. ID. No. 51):
CTGCGGCCGC ATCATGTCTG CTGTTAACGT TGC
- 40 Primer ERG1-3' (SEQ. ID. No. 52):
TTCTCGAGTT AACCAATCAA CTCACCAAAAC
- 45 Primer ERG11-5' (SEQ. ID. No. 53):
CTGCGGCCGCAGGATGTCTGCTACCAAGTCAATCG
- 45 Primer ERG11-3' (SEQ. ID. No. 54):
ATCTCGAGCTTAGATCTTTGTTCTGGATTCTC

Primer ERG2-5' (SEQ. ID. No. 55):
CTGCGGCCGCACCATGAAGTTTTCCCACT CC

Primer ERG2-3' (SEQ. ID. No. 56):
5 TTCTCGAGTTAGAACTTTGTTTGCAACAAG

Primer ERG3-5' (SEQ. ID. No. 57):
CTGCGGCCGCAATATGGATTGGTCTTAGAAGTCG

10 Primer ERG3-3' (SEQ. ID. No. 58):
AACTCGAGTCAGTTGTTCTTGGTATTG

Primer ERG4-5' (SEQ. ID. No. 59):
CTGCGGCCGCACTATGGCAAAGGATAATAGTGAG

15 Primer ERG4-3' (SEQ. ID. No. 60):
TTCTCGAGCTAGAAAACATAAGGAATAAGAC

Primer Δ24R-5' (SEQ. ID. No. 47):
20 CTGCGGCCGCAAGATGGAGCCCGCCGTGTCGC

Primer Δ24R-3' (SEQ. ID. No. 48):
AACTCGAGTCAGTGCCTGCCGCCCTG

25 1.3 Herstellung der Integrationsvektoren pUG6-tHMG, pUG6-ERG1,
pUG6-ERG11

1.3.1 pUG6-tHMG

Die DNA-Sequenz für die Expressionskassette aus ADH1-Promotor-
30 tHMG-Tryptophan-Terminator wurde aus dem Vektor YepH2 (Polakowski,
T., Stahl, U., Lang, C. (1998): Overexpression of a cytosolic
HMG-CoA reductase in yeast leads to squalene accumulation. Appl.
Microbiol. Biotechnol. 49: 66-71.) durch Restriktion mit den Enzy-
men EcoRV und Bsp68I (NruI) unter Verwendung von Standardmethoden
35 isoliert. Das erhaltene DNA-Fragment wurde in den Vektor pUG6
(Güldener, U et al. (1996): A new efficient gene disruption cas-
sette for repeated use in budding yeast, Nucleic Acids Res. Jul
1;24(13):2519-24) in die EcoRV-Schnittstelle Blunt-end einklo-
niert und ergab den Vektor mit der Bezeichnung pUG6-tHMG (Abbil-
40 dung1).

1.3.2 pUG6-ERG1

Die DNA-Sequenz für die Expressionskassette aus ADH1-Promotor-
ERG1-Tryptophan-Terminator wurde aus dem Vektor pFlat3-ERG1 durch
45 Restriktion mit den Enzymen NheI und Bsp68I (NruI) unter Verwen-
dung von Standardmethoden isoliert. Das erhaltene DNA-Fragment
wurde nach einer Klenow-Behandlung in den Vektor pUG6 (Güldener, U

et al. (1996): A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast, Nucleic Acids Res. Jul 1;24(13):2519-24) in die EcoRV-Schnittstelle Blunt-end einkloniert und ergab den Vektor mit der Bezeichnung pUG6-ERG1 (Abbildung 2).

1.3.3 pUG6-ERG11

Die DNA-Sequenz für die Expressionskassette aus ADH1-Promotor-ERG11-Tryptophan-Terminator wurde aus dem Vektor pFlat3-ERG11 durch Restriktion mit den Enzymen EcoRV und Bsp68I (NruI) unter Verwendung von Standardmethoden isoliert. Das erhaltene DNA-Fragment wurde in den Vektor pUG6 (Güldener, U et al. (1996): A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast, Nucleic Acids Res. Jul 1;24(13):2519-24) in die EcoRV-Schnittstelle Blunt-end einkloniert und ergab den Vektor mit der Bezeichnung pUG6-ERG11 (Abbildung 3).

1.4. Integrative Transformation der Expressionskassetten in die Hefestämme GRF oder GRFura3

Nach Plasmidisolation wurden Fragmente aus den Vektoren pUG6-tHMG, pUG6-ERG1 und pUG6-ERG11 mittels PCR so amplifiziert, dass die resultierenden Fragmente aus folgenden Komponenten bestehen: loxP-kanMX-loxP-ADH1-Promotor-Zielgen-Tryptophan-Terminator, wo bei unter Zielgen tHMG, ERG1 bzw. ERG11 und unter kanMX ein Kanamycin-Resistenz-Gen verstanden wird.

Als Primer wurden Oligonukleotid-Sequenzen ausgewählt, die im annealenden Bereich die Sequenzen jenseits der zu amplifizierenden Kassetten des Vektors pUG6-Zielgen enthalten und an den 5' und 3' Überhängend je 40 Basenpaare der 5' oder der 3' Sequenz des Integrationslocus enthalten. So ist gewährleistet, dass einerseits das gesamte Fragment inklusive KanMX und Zielgen amplifiziert wird und anderseits dieses Fragment anschließend in Hefe transformiert werden kann und durch homologe Rekombination in den Ziel-Genlocus der Hefe integriert. Dabei wurden je nach Ziel-Genlocus der Hefe die folgenden Oligonucleotid-Sequenzen als Primer verwendet:

40 Zur Integration an den URA3 Genlocus:

URA3-Crelox-5' (SEQ. ID. No. 33):

5'-ATGTCGAAAG CTACATATAA GGAACGTGCT GCATCTCATC CCAGCTGAAG
CTTCGTACGC-3'

45

URA3-Crelox-3' (SEQ. ID. No. 34):

5' -TTAGTTTG C TGGCCGCATC TTCTCAAATA TGCTTCCCAG GCATAGGCCA CTAGTG-
GATC TG-3'

Zur Integration an den LEU2 Genlocus:

5

LEU2-Crelox-5' (SEQ. ID. No. 35):

5' -GAATACTCAG GTATCGTAAG ATGCAAGAGT TCGAATCTCT CCAGCTGAAG
CTTCGTACGC-3'

10 LEU2-Crelox-3' (SEQ. ID. No. 36):

5' -TCTACCCTAT GAACATATT C ATTGTAA TTTCGTGTG GCATAGGCCA CTAGTG-
GATC TG-3'

Zur Integration an den HIS3 Genlocus:

15

HIS3-Crelox-5' (SEQ. ID. No. 37):

5' -ATGACAGAGC AGAAAGCCCT AGTAAAGCGT ATTACAAATG CCAGCTGAAG
CTTCGTACGC-3'

20 HIS3-Crelox-3' (SEQ. ID. No. 38):

5' -CTACATAAGA ACACCTTG G TGGAGGGAAC ATCGTTGGTA GCATAGGCCA CTAGTG-
GATC TG-3'

Zur Integration an den ERG6 Genlocus:

25

ERG6-Crelox-5' (SEQ. ID. No. 39):

5' -ATGAGTGAAA CAGAATTGAG AAAAAGACAG GCCCAATTCA CCAGCTGAAG
CTTCGTACGC-3'

30 ERG6-Crelox-3' (SEQ. ID. No. 40):

5' -TTATTGAGTT GCTTCTGGG AAGTTGGGA GGGGGTTTCG GCATAGGCCA CTAGTG-
GATC TG-3'

Zur Integration an den ERG5 Genlocus:

35

ERG5-Crelox-5' (SEQ. ID. No. 41):

5' -ATGAGTTCTG TCGCAGAAAA TATAATACAA CATGCCACTC CCAGCTGAAG
CTTCGTACGC-3'

40 ERG5-Crelox-3' (SEQ. ID. No. 42):

5' -TTATTGAG ACTTCTCCAG TAATTGGTC TCTCTTTTG GCATAGGCCA CTAGTG-
GATC TG-3'

Als Selektionsmarker diente die Resistenz gegen Geneticin (G418).

45 Die resultierenden Stämme enthielten eine Kopie des jeweiligen Zielgens (*tHMG*, *ERG1* oder *ERG11*) unter der Kontrolle des *ADH*-Promotors und des Tryptophan-Terminators. Gleichzeitig war es mög-

lich, durch die Integration der Expressionskassette das jeweilige Gen des Ziellocus zu deletieren. Um das Gen für die Resistenz gegen G418 anschliessend wieder zu entfernen wurde der entstandene Hefestamm mit dem *cre* Rekombinase enthaltenden Vektor pSH47 (Gul-
5 dener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. Nucleic Acids Res. Jul 1;24(13):2519-24.) transfor-
miert. Durch diesen Vektor wurde die *cre* Rekombinase in der Hefe exprimiert, was zur Folge hatte, dass der Sequenz-Bereich inner-
10 halb der beiden *loxP*-Sequenzen heraus rekombinierte, was wiederum zur Folge hatte, dass lediglich eine der beiden *loxP*-Sequenzen und die *ADH1*-Promotor-ZielGen-Tryptophan-Terminator-Expressionsskas-
setten in dem Ziel-Genlocus enthalten blieb.

15 Die Folge ist, dass der Hefestamm seine G418-Resistenz wieder verliert und damit geeignet ist, weitere Gene mittels dieses "cre-lox" Systems in den Hefestamm zu integrieren bzw. zu entfernen. Der Vektor pSH47 kann daraufhin durch Anzucht auf FOA-Medium selektiv entfernt werden.

20

Somit ist es möglich nacheinander mehrere Zielgene in den Hefestamm unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors und Tryptophan-Terminators an verschiedene Zielloci zu integrieren.

25 Zunächst wird ein Zielgen an den *URA3* Locus integriert bzw. wird ein *ura3*-Stamm verwendet, damit der Hefestamm Uracil auxotroph ist, da der Vektor pSH47 ein *URA3* Gen zur Selektion Uracil-prototroper Stämme enthält. Abbildung 4 zeigt ein methodisches Bei-
spiel.

30

Durch diese Methode wurden die in Tabelle 1 aufgelisteten Hefe-Integrations- bzw. Deletionsstämme hergestellt, wobei, in an sich bekannter Weise, das Gen in Kleinbuchstaben für eine Deletion, das Gen in Großbuchstaben für eine Integration steht.

35

Tabelle 1

	Nr.	Stammbezeichnung	Veränderung gegenüber Hefestamm GRF
40	I	GRFtH1	<i>ura3</i> , <i>tHMG:leu2</i>
	II	GRFtH1E1	<i>ERG1:ura3</i> , <i>tHMG:leu2</i>
	III	GRFtH1E11	<i>ura3</i> , <i>tHMG:leu2</i> , <i>ERG11:his3</i>
	IV	GRFtH1E1E11	<i>ERG1:ura3</i> , <i>tHMG:leu2</i> , <i>ERG11:his3</i>
45	V	GRFtH1E1E11erg5e rg6	<i>ura3</i> , <i>tHMG:leu2</i> , <i>ERG1:erg6</i> , <i>ERG11:erg5</i>
	VI	GRFtH1erg5erg6	<i>ura3</i> , <i>tHMG:leu2</i> , <i>erg5</i> , <i>erg6</i>

Die Hefestämme wurden 48 Stunden lang in WMVIII- Medium bei 28°C und 160 rpm in einem Kulturvolumen von 20 ml kultiviert. Anschliessend wurden 500 µl dieser Vorkultur in eine 50 ml Hauptkultur des gleichen Mediums überführt und für 3 Tage bei 28°C und 160 rpm in einem Schikanekolben kultiviert.

Die Sterole und Squalen wurden nach 3 Tagen extrahiert (Parks LW, Bottema CD, Rodriguez RJ, Lewis TA. (1985) Yeast sterols: yeast mutants as tools for the study of sterol metabolism. Methods Enzymol. 1985;111:333-46.) und mittels Gaschromatographie analysiert. Es ergaben sich folgende Werte (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2

Nr	Stammbezeichnung	Gehalt an Sterolen 1 bis 11 in [Peakfläche/gTS]										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
I	GRFtH1	9,9	0,8	0,3	1,2	1,1	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,7
II	GRFtH1E1	6,8	1,9	0,4	1,5	2,2	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	6,9
II	GRFtH1E11	9,9	0,4	0,7	2,3	1,9	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0
I												
IV	GRFtH1E1E11	6,0	1,2	0,9	3,0	2,3	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	7,2
V	GRFtH1E1E11 erg5erg6	5,8	0,8	0,4	23, 1	0,0	0,0	0,0	0,0	11, 8	0,0	0,0
VI	GRFtH1erg5e rg6	9,9	0,8	0,3	12, 6	0,0	0,0	0,0	0,0	7,1	0,0	0,0

- 1 = Squalen
- 2 = Lanosterol
- 3 = Dimethyl-Zymosterol
- 4 = Zymosterol
- 5 = Fecosterol
- 6 = Episterol
- 7 = Cholesta-7,24-dienol
- 8 = Cholesta-8-enol
- 9 = Cholesta-5,7,24 trienol
- 10 = 7-Dehydrocholesterol
- 11 = Ergosterol

Beispiel 2
Expression des heterologen Gens kodierend eine Δ8-Δ7-Isomerase (Ebp) aus der Maus (*Mus musculus*) in Hefe

Die cDNA-Sequenz der Δ8-Δ7-Isomerase aus *Mus musculus* (Moebius, F.F., Soellner, K.E.M., Fiechter, B., Huck, C.W., Bonn, G., Glossmann, H. (1999): Histidine77, Glutamic Acid123, Threo-

nine126, Asparagine194, and Tryptophan197 of Human Emopamil Protein Are Required for in Vivo Sterol Δ 8- Δ 7 Isomerisation. Biochem. 38, 1119-1127.) wurde durch PCR aus dem cDNA-Klon IMAGp998A22757 (Host: *E.coli* DH10B) des Deutschen Resourcenzentrums für Genom-
5 forschung GmbH (Berlin) amplifiziert.

Die hierbei verwendeten Primer sind die DNA-Oligomere Ebp-5' (SEQ. ID. No. 43) und Ebp-3' (SEQ. ID. No. 44). Das erhaltene DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *XhoI* be-
10 handelt und anschliessend in den Vektor pFlat3 und pFlat1 (Abbil-
dung 4), die zuvor ebenfalls mit den Enzymen *NotI* und *XhoI* behan-
delt wurden, mittels einer Ligase-Reaktion integriert. Die resul-
tierenden Vektoren pFlat1-*EBP* und pFlat3-*EBP* (Abbildung 5a) ent-
halten das *EBP*-Gen unter der Kontrolle des *ADH*-Promotors und des
15 Tryptophan-Terminators.

Der Expressionsvektor pFlat3-*EBP* wurde anschließend in die Hefe-
stämme I bis VI der Tabelle 1 aus Beispiel 1 sowie in den Stamm
GRFura3 transformiert. Die so gewonnenen Hefestämme wurden an-
20 schliessend 48 Stunden lang in WMVIII- Medium bei 28°C und 160 rpm
in einem 20 ml Kulturvolumen kultiviert. Anschliessend wurden 500
 μ l dieser Vorkultur in eine 50 ml Hauptkultur des gleichen Medi-
ums überführt und für 3 Tage bei 28°C und 160 rpm in einem Schika-
nekolben kultiviert.

25 Die Sterole wurden wie in Beispiel 1 beschrieben nach 3 Tagen ex-
trahiert und mittels Gaschromatographie analysiert. Der Einfluss
der Expression einer Δ 8- Δ 7-Isomerase aus *Mus musculus* in Kombina-
tion mit der Expression der transkriptionell deregulierten hefe-
30 eigenen Gene *tHMG* und/oder *ERG1* und/oder *ERG11* und/oder der Dele-
tion der hefe eigenen Gene *ERG6* und *ERG5* ist in Tabelle 3 aufgeli-
stet. Die Abkürzungen bedeuten: - = Abnahme; 0 = keine Verände-
zung; / = nicht vorhanden; +, ++, +++, ++++ = angereichert bis
stark angereichert.

35

40

45

Tabelle 3

Nr	Stammbezeichnung	Einfluß der genetischen Veränderungen auf den Sterolgehalt gegenüber dem Hefe-Stamm GRF										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
VII	GRFtH1 pFlat3-Ebp	0	0	0	0	0	0	/	/	/	/	0
VIII	GRFtH1E1 pFlat3-Ebp	0	0	0	-	0	0	+	/	/	/	0
IX	GRFtH1E11 pFlat3-Ebp	0	0	0	-	0	0	+	/	/	/	0
X	GRFtH1E1E11 pFlat3-Ebp	0	0	0	-	0	0	+	/	/	/	0
XI	GRFtH1E1E11erg5e rg6 pFlat3-Ebp	0	0	0	--	/	/	+	/	++	/	/
XII	GRFtH1erg5erg6 pFlat3-Ebp	0	0	0	-	/	/	+	/	+	/	/

20

- 1 = Squalen
- 2 = Lanosterol
- 3 = Dimethyl-Zymosterol
- 4 = Zymosterol
- 5 = Fecosterol
- 6 = Episterol
- 7 = Cholesta-7,24-dienol
- 8 = Cholesta-8-enol
- 9 = Cholesta-5,7,24 trienol
- 10 = 7-Dehydrocholesterol
- 11 = Ergosterol

Beispiel 3

Expression des heterologen Gens kodierend eine Δ5-Desaturase

35 (Sc5d) aus der Maus (*Mus musculus*) in Hefe

Die cDNA-Sequenz der Δ5-Desaturase aus *Mus musculus* (Nishi, S., Hideaki, N., Ishibashi, T. (2000): cDNA cloning of the mammalian sterol C5-desaturase and the expression in yeast mutant. Biochim. Biophys.A 1490, 106-108.) wurde durch PCR aus dem cDNA-Klon IMAGp998K144618 (Host: *E.coli* DH10B) des Deutschen Resourcen- trums für Genomforschung GmbH (Berlin) amplifiziert. Die hierbei verwendeten Primer sind die DNA-Oligomere Sc5d-5' (SEQ. ID. No. 45) und Sc5d-3' (SEQ. ID. No. 46). Das erhaltene DNA-Fragment 40 wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *XhoI* behandelt und anschliessend in den Vektor pFlat3 (Abbildung 4), der zuvor ebenfalls mit den Enzymen *NotI* und *XhoI* behandelt wurde, mittels ei- 45

ner Ligase-Reaktion integriert. Der resultierende Vektor pFlat3-SC5D (Abbildung 5b) enthält das SC5D-Gen unter der Kontrolle des ADH-Promotors und des Tryptophan-Terminators.

- 5 Der Expressionsvektor pFlat3-SC5D wurde anschliessend in die Hefestämme I bis VI der Tabelle 1 aus Beispiel 1 sowie in den Stamm GRFura3 transformiert. Die so gewonnenen Hefestämme wurden anschliessend 48 Stunden lang in WMVIII- Medium bei 28°C und 160 rpm in einem 20 ml Kulturvolumen kultiviert. Anschliessend wurden 10 500 µl dieser Vorkultur in eine 50 ml Hauptkultur des gleichen Mediums überführt und für 3 Tage bei 28°C und 160 rpm in einem Schikanekolben kultiviert.

Die Sterole wurden wie in Beispiel 1 beschrieben nach 3 Tagen ex-
15 trahiert und mittels Gaschromatographie analysiert. Der Einfluss der Expression einer Δ5-Desaturase aus *Mus musculus* in Kombination mit der Expression der transkriptionell deregulierten hefe-eigenen Gene tHMG und/oder ERG1 und/oder ERG11 und/oder der Deletion der hefe-eigenen Gene ERG6 und ERG5 ist in Tabelle 4 aufgelistet. Die Abkürzungen bedeuten: - = Abnahme; 0 = keine Veränderung; / = nicht vorhanden; +, ++, +++, ++++ = angereichert bis stark angereichert.

Tabelle 4

25

		Einfluß der genetischen Veränderungen auf den Sterolgehalt gegenüber dem Hefe-Stamm GRF										
Nr	Stammbezeichnung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
30	XIII GRFTH1 pFlat3-Sc5d	0	0	0	0	0	0	/	/	/	/	0
35	XIV GRFTH1E1 pFlat3-Sc5d	0	0	0	-	0	0	/	/	+	/	0
XV	GRFTH1E11 pFlat3-Sc5d	0	0	0	-	0	0	/	/	+	/	0
40	XVI GRFTH1E1E11 pFlat3-Sc5d	0	0	0	-	0	0	/	/	+	/	0
XVII	GRFTH1E1E11erg5e rg6 pFlat3-Sc5d	0	-	0	--	/	/	/	/	++	+	/
XVIII	GRFTH1erg5erg6 pFlat3-Sc5d	0	0	0	--	/	/	/	/	++	/	/

1 = Squalen

45 2 = Lanosterol

3 = Dimethyl-Zymosterol

4 = Zymosterol

- 5 = Fecosterol
- 6 = Episterol
- 7 = Cholesta-7,24-dienol
- 8 = Cholesta-8-enol
- 5 9 = Cholesta-5,7,24 trienol
- 10 = 7-Dehydrocholesterol
- 11 = Ergosterol

Beispiel 4

10 Expression des heterologen Gens kodierend eine Δ24-Reduktase (D24R) aus der Maus (*Mus musculus*) in Hefe

Die cDNA-Sequenz der Δ24-Reduktase aus *Mus musculus* (Waterham, H.R., Koster, J., Romeijn, G.J., Hennekam, R.C., Vreken, P., Andersson, H.C., FitzPatrick, D.R., Kelley, R.I. and Wanders, R.J., Mutations in the 3beta-Hydroxysterol Delta24-Reductase Gene Cause Desmosterolosis, an Autosomal Recessive Disorder of Cholesterol Biosynthesis, Am. J. Hum. Genet. 69 (4), 685-694 (2001)) wurde durch PCR aus dem cDNA-Klon IMAGp998K179532 (Host: *E.coli* DH10B) 20 des Deutschen Resourcenzentrums für Genomforschung GmbH (Berlin) amplifiziert.

Die hierbei verwendeten Primer sind die DNA-Oligomere D24R-5' (SEQ. ID. No. 47) und D24R-3' (SEQ. ID. No. 48). Das erhaltene 25 DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *XhoI* behandelt und anschliessend in den Vektor pFlat4 (Abbildung 6), der zuvor ebenfalls mit den Enzymen *NotI* und *XhoI* behandelt wurde, mittels einer Ligase-Reaktion integriert. Der resultierende Vektor pFlat4-D24R (Abbildung 5d) enthält das *D24R*-Gen unter der 30 Kontrolle des *ADH1*-Promotors und des Tryptophan-Terminators.

Der Expressionsvektor pFlat4-D24R wurde anschliessend in die Hefestämme I bis VI der Tabelle 1 aus Beispiel 1 sowie in den Stamm GRFura3 transformiert. Die so gewonnenen Hefestämme wurden anschliessend 48 Stunden lang in WMVIII- Medium bei 28°C und 160 rpm 35 in einem 20 ml Kulturvolumen kultiviert. Anschliessend wurden 500 µl dieser Vorkultur in eine 50 ml Hauptkultur des gleichen Mediums überführt und für 3 Tage bei 28°C und 160 rpm in einem Schikanekolben kultiviert.

40 Die Sterole wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, nach 3 Tagen extrahiert und mittels Gaschromatographie analysiert. Der Einfluss der Expression einer Δ24-Reduktase aus *Mus musculus* in Kombination mit der Expression der transkriptionell deregulierten 45 hefe eigenen Gene *tHMG* und/oder *ERG1* und/oder *ERG11* und/oder der Deletion der hefe eigenen Gene *ERG6* und *ERG5* ist in Tabelle 5 aufgelistet. Die Abkürzungen bedeuten: - = Abnahme; 0 = keine Verän-

83

derung; / = nicht vorhanden; +, ++, +++, ++++ = angereichert bis stark angereichert.

Tabelle 5

Nr	Stammbezeichnung	Einfluß der genetischen Veränderungen auf den Sterolgehalt gegenüber dem Hefestamm GRF										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
XIX	GRFtH1 pFlat4-D24R	0	0	0	0	0	0	/	/	/	/	0
XX	GRFtH1E1 pFlat4-D24R	0	-	-	-	0	0	/	/	/	+	0
XXI	GRFtH1E11 pFlat4-D24R	0	0	0	-	0	0	/	+	/	+	0
XXII	GRFtH1E1E11 pFlat4-D24R	0	0	0	-	0	0	/	+	/	+	0
XXIII	GRFtH1E1E11erg5e rg6 pFlat4-D24R	0	-	-	--	/	/	0	+	+	++	/
XXIV	GRFtH1erg5erg6 pFlat4-D24R	0	-	-	--	/	/	0	+	+	++	/

1 = Squalen

25 2 = Lanosterol

3 = Dimethyl-Zymosterol

4 = Zymosterol

5 = Fecosterol

6 = Episterol

30 7 = Cholesta-7,24-dienol

8 = Cholesta-8-enol

9 = Cholesta-5,7,24 trienol

10 = 7-Dehydrocholesterol

11 = Ergosterol

35

Beispiel 5

Gemeinsame Expression der heterologen Gene kodierend eine Δ8-Δ7 Isomerase (Ebp) aus der Maus (*Mus musculus*) und eine C5-Desaturase (Sc5d) aus der Maus (*Mus musculus*) in Hefe

40

Die Expressionsvektoren pFlat1-EBP (aus Beispiel 2) und pFlat3-SC5D (aus Beispiel 3) wurden in die Hefestämme I bis VI der Tabelle 1 aus Beispiel 1 sowie in den Stamm GRFura3 transformiert. Die so gewonnenen Hefestämme wurden anschliessend 48 Stunden lang in WMVIII- Medium bei 28°C und 160 rpm in einem 20 ml Kulturvolumen kultiviert. Anschliessend wurden 500 µl dieser Vorkultur in eine 50 ml Hauptkultur des gleichen Mediums überführt

und für 3 Tage bei 28°C und 160 rpm in einem Schikanekolben kulti-
viert.

Die Sterole wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, nach 3 Tagen
 5 extrahiert und mittels Gaschromatographie analysiert. Der Ein-
 fluss der Expression einer Δ8-Δ7 Isomerase und einer C5-Desatu-
 rase aus *Mus musculus* in Kombination mit der Expression der
 transkriptionell deregulierten hefeeigenen Gene *tHMG* und/oder
 10 *ERG1* und/oder *ERG11* und/oder der Deletion der hefeeigenen Gene
ERG6 und *ERG5* ist in Tabelle 6 aufgelistet. Die Abkürzungen be-
 deuten: - = Abnahme; 0 = keine Veränderung; / = nicht vorhanden;
 +, ++, +++, ++++ = angereichert bis stark angereichert.

Tabelle 6

		Einfluß der genetischen Veränderungen auf den Sterolgehalt gegenüber dem Hefestamm GRF										
Nr.	Stammbezeichnung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
XXV	GRFtH1 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d	0	0	0	-	0	0	/	/	+	/	0
XXVI	GRFtH1E1 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d	0	-	0	--	0	0	/	/	+	/	0
XXVII	GRFtH1E11 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d	0	0	0	--	0	0	/	/	+	/	0
XXVII I	GRFtH1E1E11 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d	0	-	-	--	0	0	/	/	++	/	0
XXIX	GRFtH1E1E11erg5e rg6 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d	0	-	0	--	/	/	/	/	++	+	/
XXX	GRFtH1erg5erg6 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d	0	0	0	-	/	/	/	/	++	+	/

- 1 = Squalen
- 2 = Lanosterol
- 3 = Dimethyl-Zymosterol
- 4 = Zymosterol
- 5 = Fecosterol
- 6 = Episterol
- 7 = Cholesta-7,24-dienol
- 8 = Cholesta-8-enol
- 9 = Cholesta-5,7,24 trienol

10 = 7-Dehydrocholesterol

11 = Ergosterol

Beispiel 6

- 5 Gemeinsame Expression der heterologen Gene kodierend eine $\Delta 8-\Delta 7$ Isomerase (Ebp) aus der Maus (*Mus musculus*), kodierend eine C5-Desaturase (Sc5d) aus der Maus (*Mus musculus*) und eine $\Delta 24$ -Reduktase aus der Maus (*Mus musculus*) in Hefe
- 10 Die Expressionsvektoren pFlat1-*EBP* (aus Beispiel 2) und pFlat3-*SC5D* (aus Beispiel 3) und pFlat4-*D24R* (aus Beispiel 4) wurden in die Hefestämme I bis VI der Tabelle 1 aus Beispiel 1 sowie in den Stamm GRFura3 transformiert. Die so gewonnenen Hefestämme wurden anschliessend 48 Stunden lang in WMVIII- Medium bei 28°C und 160 rpm in einem 20 ml Kulturvolumen kultiviert. Anschliessend wurden 500 µl dieser Vorkultur in eine 50 ml Hauptkultur des gleichen Mediums überführt und für 3 Tage bei 28°C und 160 rpm in einem Schikanekolben kultiviert.
- 15 20 Die Sterole wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, nach 3 Tagen extrahiert und mittels Gaschromatographie analysiert. Der Einfluss der Expression einer $\Delta 8-\Delta 7$ Isomerase, einer C5-Desaturase und einer $\Delta 24$ -Reduktase aus *Mus musculus* in Kombination mit der Expression der transkriptionell deregulierten hefe eigenen Gene
- 25 25 *tHMG* und/oder *ERG1* und/oder *ERG11* und/oder der Deletion der hefe eigenen Gene *ERG6* und *ERG5* ist in Tabelle 7 aufgelistet. Die Abkürzungen bedeuten: - = Abnahme; 0 = keine Veränderung; / = nicht vorhanden; +, ++, +++, ++++ = angereichert bis stark angereichert.
- 30

Tabelle 7

		Einfluß der genetischen Veränderungen auf den Sterolgehalt gegenüber dem Hefestamm GRF											
		Nr	Stammbezeichnung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
35	XXXI	GRFtH1 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d/ pFlat4-D24R	0	0	0	-	0	0	/	/	/	+	0
40	XXXII	GRFtH1E1 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d/ pFlat4-D24R	0	-	0	--	0	0	/	/	/	+	0
45													

	XXXII I	GRFtH1E11 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d/ pFlat4-D24R	0	0	0	--	0	0	/	/	/	+	0
5	XXXIV	GRFtH1E1E11 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d/ pFlat4-D24R	0	-	-	--	0	0	/	/	/	++	0
10	XXXV	GRFtH1E1E11erg5e rg6 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d/ pFlat4-D24R	0	-	0	--	/	/	/	/	+	++ ++	/
15	XXXVI	GRFtH1erg5erg6 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d/ pFlat4-D24R	0	0	0	-	/	/	/	/	++	++ +	/

- 1 = Squalen
 2 = Lanosterol
 3 = Dimethyl-Zymosterol
 20 4 = Zymosterol
 5 = Fecosterol
 6 = Episterol
 7 = Cholesta-7,24-dienol
 8 = Cholesta-8-enol
 25 9 = Cholesta-5,7,24 trienol
 10 = 7-Dehydrocholesterol
 11 = Ergosterol

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von Organismen die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase-Aktivität}$, $\Delta 5\text{-Desaturase-Aktivität}$ und $\Delta 24\text{-Reduktase-Aktivität}$ aufweisen.
10
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Organismen gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens zwei der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase-Aktivität}$, $\Delta 5\text{-Desaturase-Aktivität}$ und
15 $\Delta 24\text{-Reduktase-Aktivität}$ aufweisen
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Organismen gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase-Aktivität}$, $\Delta 5\text{-Desaturase-Aktivität}$ und
20 $\Delta 24\text{-Reduktase-Aktivität}$ aufweisen.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase-Aktivität}$ die Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine
25 $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase}$ gegenüber dem Wildtyp erhöht.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Genexpression eine oder mehrere Nukleinsäuren, codierend eine $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase}$, in den Organismus einbringt.
30
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, und die die enzymatische Eigenschaft einer $\Delta 8\text{-}\Delta 7\text{-Isomerase}$ aufweisen.
35
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 einbringt.
40

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure, codierend eine $\Delta 5$ -Desaturase, gegenüber dem Wildtyp erhöht.
5
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Genexpression eine oder mehrere Nukleinsäuren codierend eine $\Delta 5$ -Desaturase, in den Organismus einbringt.
10
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4, und die die enzymatische Eigenschaft einer $\Delta 5$ -Desaturase aufweisen.
15
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 3 einbringt.
20
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der $\Delta 24$ -Reduktase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure, codierend eine $\Delta 24$ -Reduktase, gegenüber dem Wildtyp erhöht.
25
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Genexpression eine oder mehrere Nukleinsäuren codierend eine $\Delta 24$ -Reduktase, in den Organismus einbringt.
30
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6, und die die enzymatische Eigenschaft einer $\Delta 24$ -Reduktase aufweisen.
35
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 5 einbringt.
40

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Organismen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe C24-Methyltransferase-Aktivität und Δ22-Desaturase-Aktivität aufweisen.
5
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Organismen gegenüber dem Wildtyp eine reduzierte C24-Methyltransferase-Aktivität und eine reduzierte Δ22-Desaturase-Aktivität aufweisen.
10
18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Reduzierung der C24-Methyltransferase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine C24-Methyltransferase gegenüber dem Wildtyp reduziert.
15
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Organismus verwendet, der kein funktionelles C24-Methyltransferase-Gen aufweist.
20
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Reduzierung der Δ22-Desaturase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Δ22-Desaturase gegenüber dem Wildtyp reduziert.
25
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Organismus verwendet, der kein funktionelles Δ22-Desaturase-Gen aufweist.
- 30 22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Organismen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, Squaleneoxidase-Aktivität, Squalensynthetase-Aktivität und Sterol-Acyltransferase-Aktivität aufweisen.
35
23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Organismen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität und eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität aufweisen.
40
24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase gegenüber dem Wildtyp erhöht.
45

90

25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Genexpression eine oder mehrere Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, in den Organismus einbringt.

5

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 8 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 8, und die die enzymatische Eigenschaft einer Lanosterol-C14-Demethylase aufweisen.

10

15 27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 7 einbringt.

20

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase gegenüber dem Wildtyp erhöht.

25

29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Genexpression ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend eine Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase in den Organismus einbringt, deren Expression in dem Organismus, verglichen mit dem Wildtyp, einer reduzierten Regulation unterliegt.

30

30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäurekonstrukt einen Promotor enthält, der in dem Organismus, verglichen mit dem Wildtyp-Promotor, einer reduzierten Regulation unterliegt.

35

31. Verfahren nach Anspruch 29 oder 30, dadurch gekennzeichnet, daß man als Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase eine Nukleinsäure verwendet, deren Expression in dem Organismus, verglichen mit der Organismus eigenen, orthologen Nukleinsäure, einer reduzierten Regulation unterliegt.

40

32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß man als Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase eine Nukleinsäure verwendet, die den katalytischen Bereich der HMG-CoA-Reduktase kodiert.

A1

33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 10 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von 5 Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 10, und die die enzymatische Eigenschaft einer HMG-CoA-Reduktase aufweisen.
- 10 34. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 9 einbringt.
- 15 35. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Organismus verwendet, der zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Squalenepoxidase-Aktivität aufweist.
- 20 36. Verfahren nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Squalenepoxidase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Squalenepoxidase gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 25 37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Genexpression eine oder mehrere Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, in den Organismus einbringt.
- 30 38. Verfahren nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, daß man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 12 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. 35 NO. 12, und die die enzymatische Eigenschaft einer Squalenepoxidase aufweisen.
- 40 39. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 11 einbringt.
- 45 40. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 39, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismus Hefe verwendet.
41. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß man nach dem Kultivieren den Organismus erntet und anschließend 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen bio-

synthetische Zwischen- und/oder Folgeprodukte aus dem Organismus isoliert.

42. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine Δ8-Δ7-Isomerase, Nukleinsäuren codierend eine Δ5-Desaturase und Nukleinsäuren codierend eine Δ24-Reduktase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.
- 5 43. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 42, enthaltend zusätzlich mindestens eine Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase, Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, Nukleinsäuren codierend eine Squalenepoxidase, Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase und Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.
- 10 44. Kombination aus Nukleinsäurekonstrukten, wobei die Kombination mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt, ausgewählt aus der Gruppe A bis C
- 15 25 A Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Δ8-Δ7-Isomerase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,
- 20 B Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Δ5-Desaturase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten und
- 25 C Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Δ24-Reduktase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,
- 30 40 und mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt, ausgewählt aus der Gruppe D bis H
- 45

- D Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,
- E Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,
- F Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Squalene-Poxidase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,
- G Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,
- H Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten
- umfasst.
45. Nukleinsäurekonstrukte oder Kombination von Nukleinsäurekonstrukten gemäß einem der Ansprüche 42 bis 44, dadurch gekennzeichnet, daß die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren und einen oder mehrere Terminatoren enthalten, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.
46. Nukleinsäurekonstrukte oder Kombination von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, daß man Regulationssignale verwendet, die die Transkription und Translation in Hefen gewährleisten.

47. Genetisch veränderter Organismus, wobei die genetische Veränderung mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Δ 8- Δ 7-Isomerase-Aktivität, Δ 5-Desaturase-Aktivität und Δ 24-Reduktase-Aktivität gegenüber einem Wildtyp erhöht.
5
48. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 47, dadurch gekennzeichnet, daß die Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten durch eine Erhöhung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine Δ 8- Δ 7-Isomerase, Nukleinsäuren codierend eine Δ 5-Desaturase und Nukleinsäuren kodierend eine Δ 24-Reduktase, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.
10
49. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine Δ 8- Δ 7-Isomerase und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine Δ 5-Desaturase und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren kodierend eine Δ 24-Reduktase enthält.
15
- 20 50. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 47 bis 49, dadurch gekennzeichnet, daß die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe C24-Methyltransferase-Aktivität und Delta22-Desaturase-Aktivität gegenüber einem Wildtyp reduziert.
25
51. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, daß die Reduzierung mindestens einer der Aktivitäten durch eine Reduzierung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine C24-Methyltransferase und Nukleinsäuren kodierend eine Delta22-Desaturase, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.
30
- 35 52. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 51, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus kein funktionelles C24-Methyltransferase-Gen und/oder Delta22-Desaturase-Gen aufweist.
40
53. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 47 bis 52, dadurch gekennzeichnet, daß die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Lanosterol-C14-Demethylase-Aktivität, Squalenepoxidase-Aktivität, Squalensynthetase-Aktivität und Sterol-Acyltransferase-Aktivität, gegenüber einem Wildtyp erhöht.
45

54. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, daß die Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten durch eine Erhöhung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase, Nukleinsäuren codierend eine Squaleneoxidase, Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase und Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.
- 10 55. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 54, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine Lanosterol-C14-Demethylase und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine Squaleneoxidase und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine Squalensynthetase und/oder zwei oder mehr Nukleinsäuren codierend eine Sterol-Acyltransferase enthält.
- 15 56. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 47 bis 56, dadurch gekennzeichnet, daß der genetisch veränderte Organismus gegenüber dem Wildtyp einen erhöhten Gehalt an 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten aufweist.
- 20 57. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 47 bis 56, dadurch gekennzeichnet daß man als Organismus Hefe verwendet.
- 25 58. Verwendung eines genetisch veränderten Organismus nach einem der Ansprüche 47 bis 57 zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten.

35

40

45

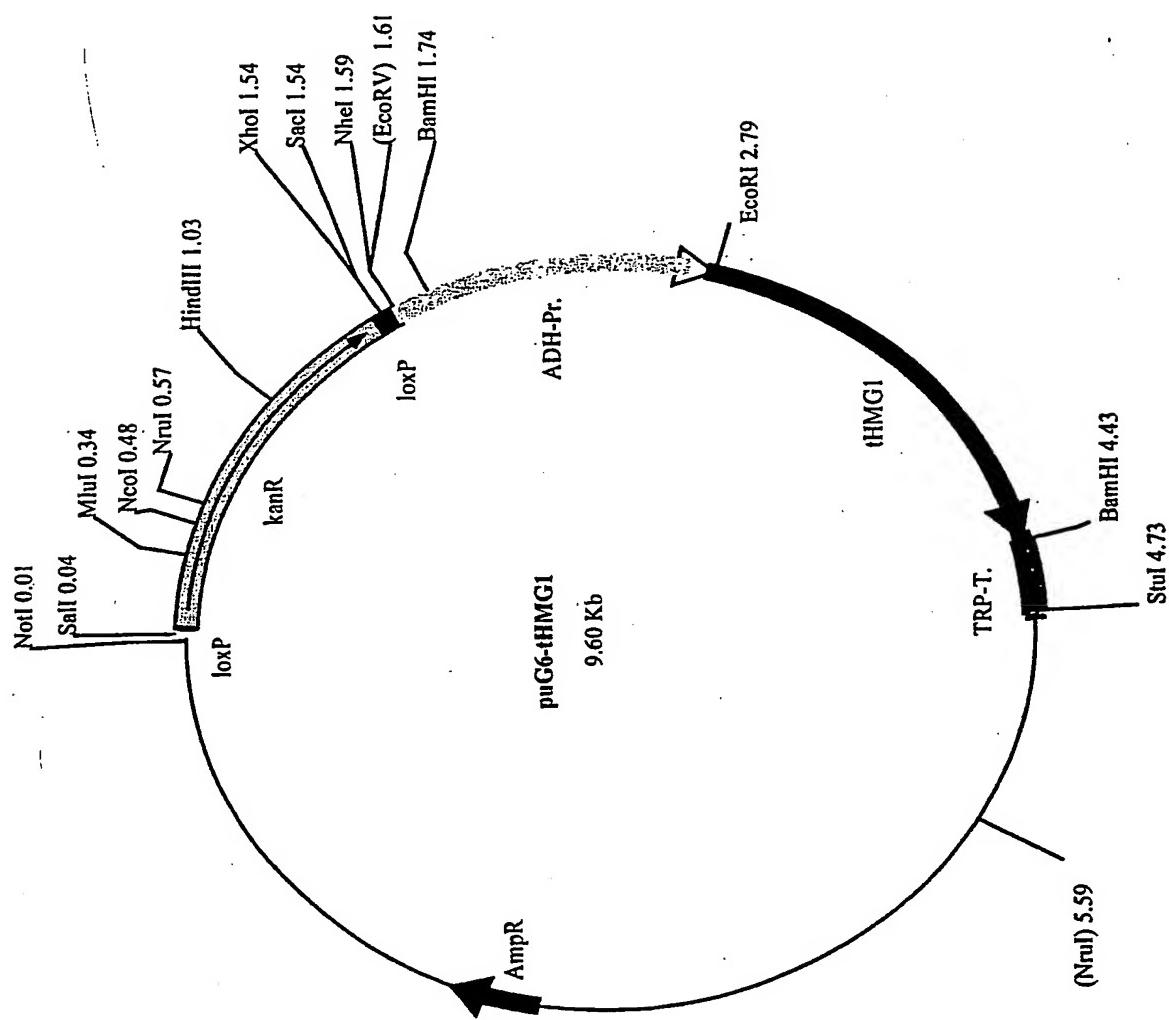


Abbildung 1

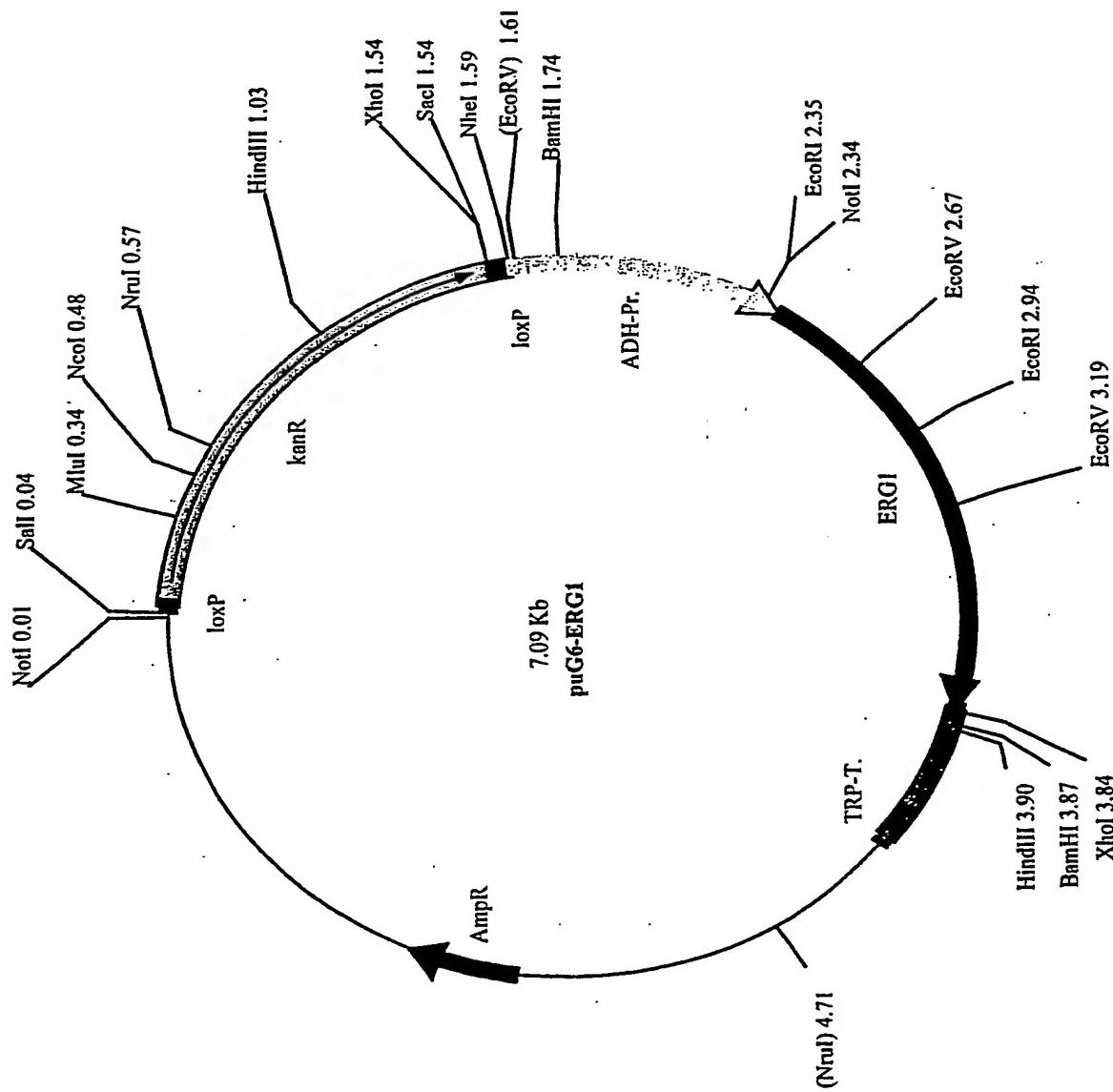


Abbildung 2

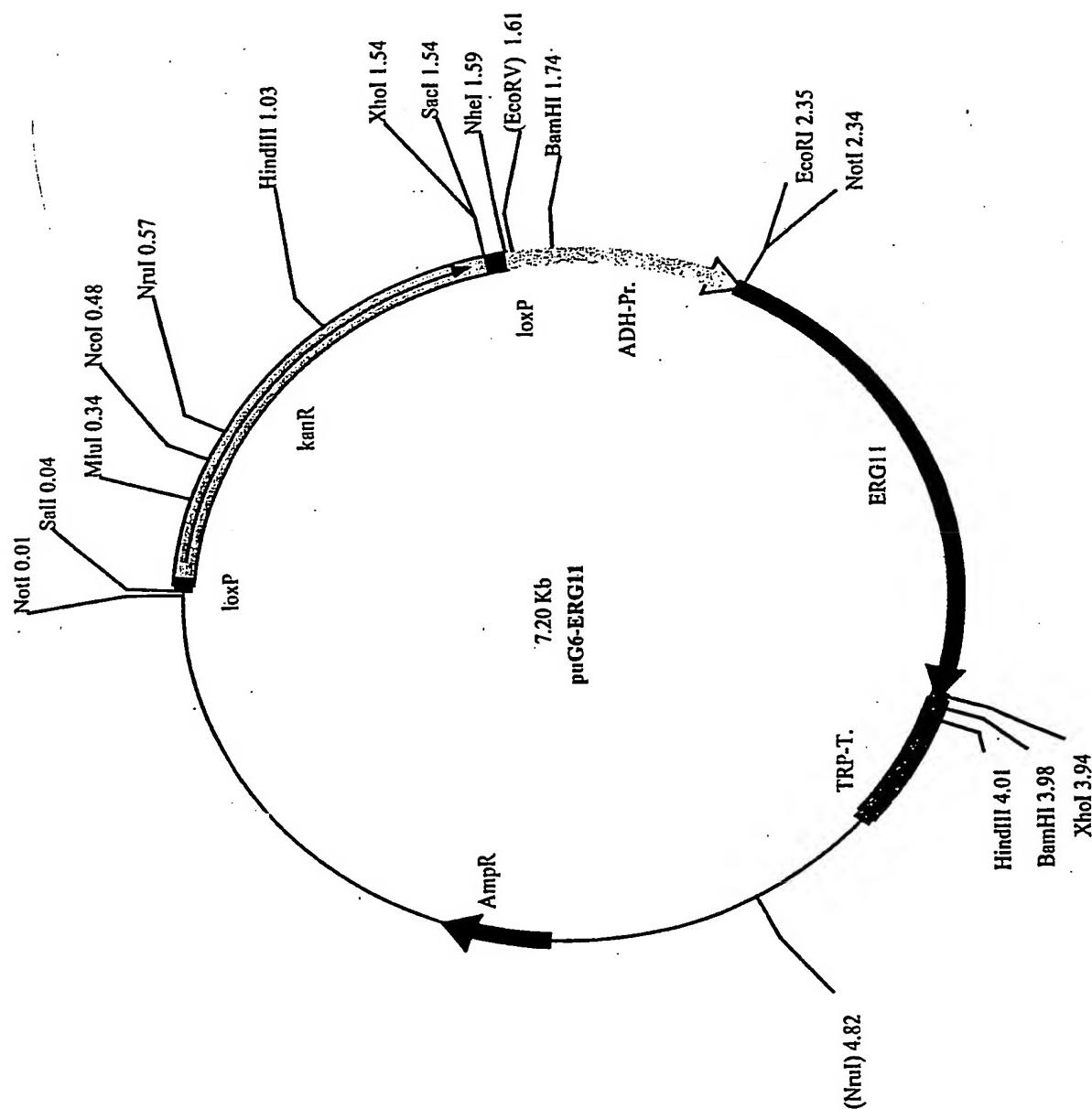
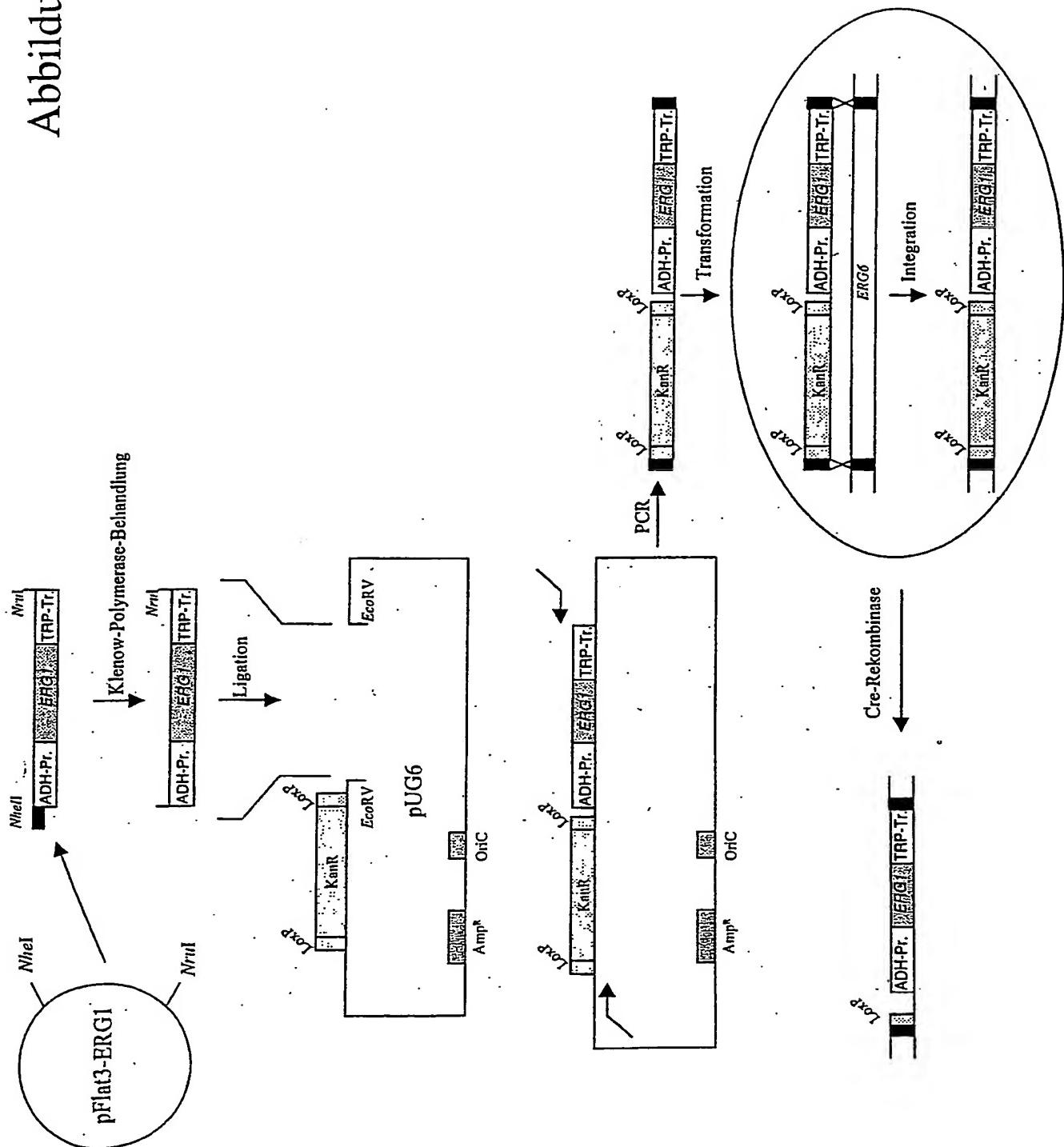


Abbildung 3

Abbildung 4



ERSATZBLATT (REGEL 26)

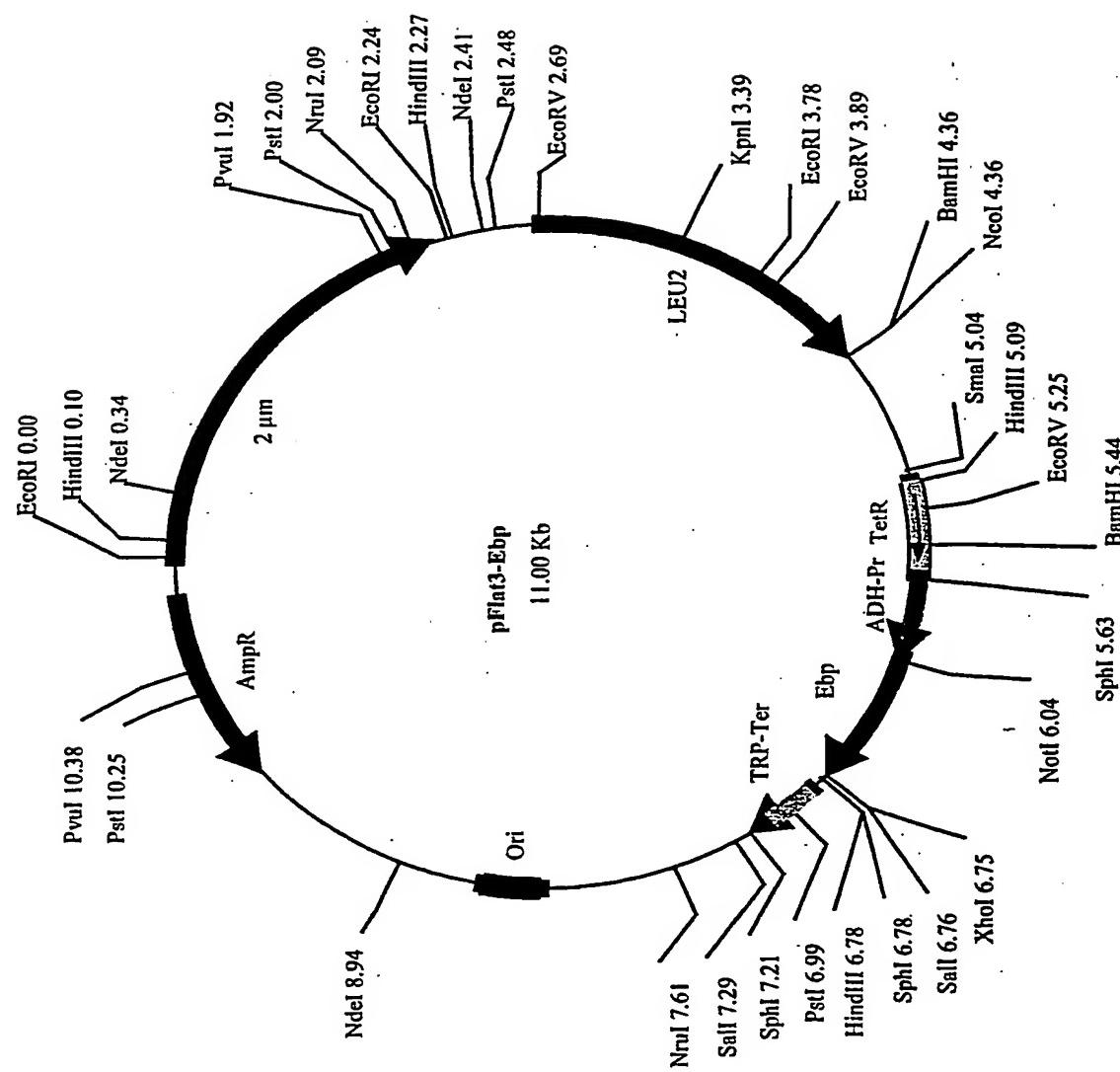


Abbildung 5a

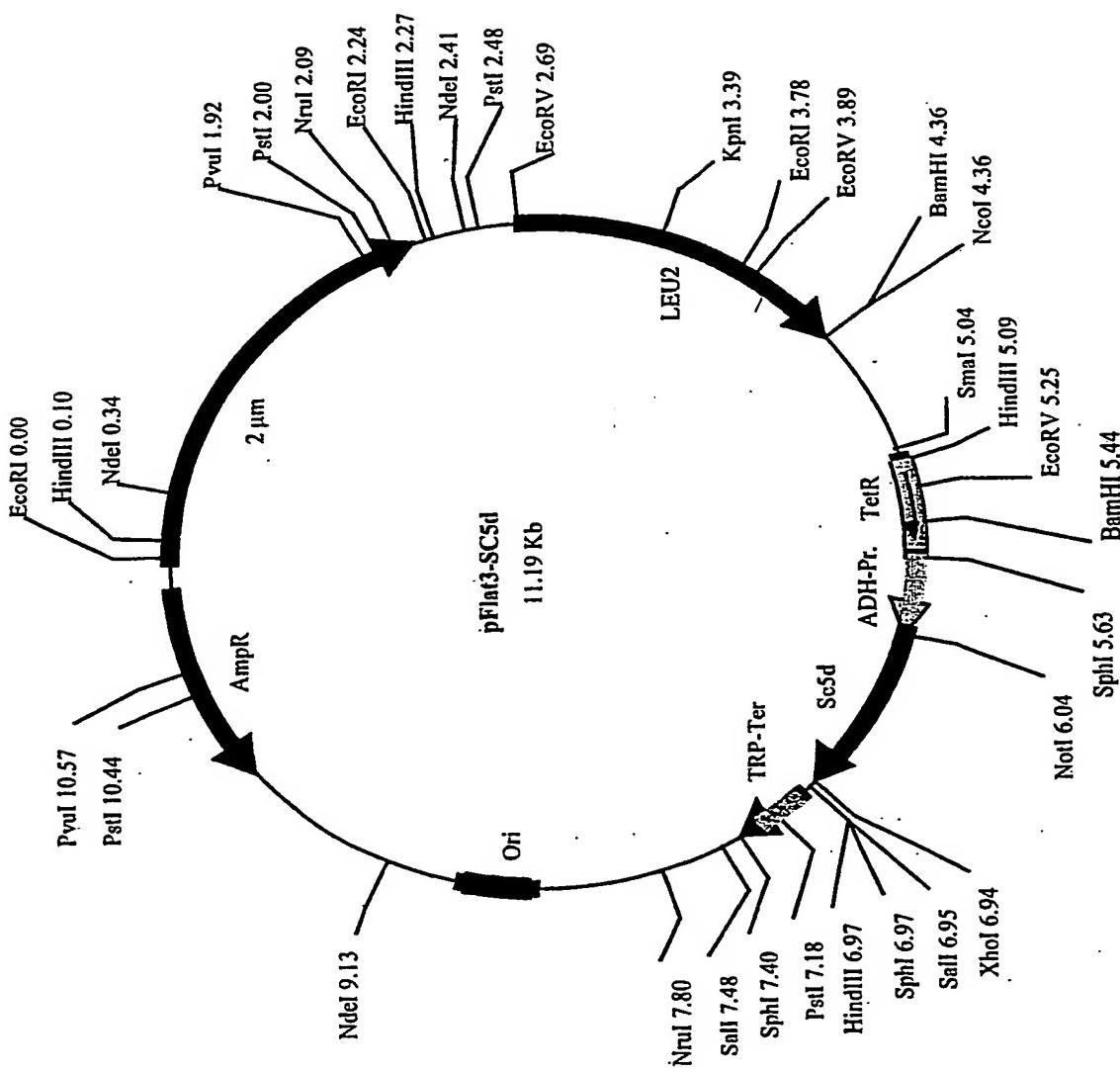


Abbildung 5b

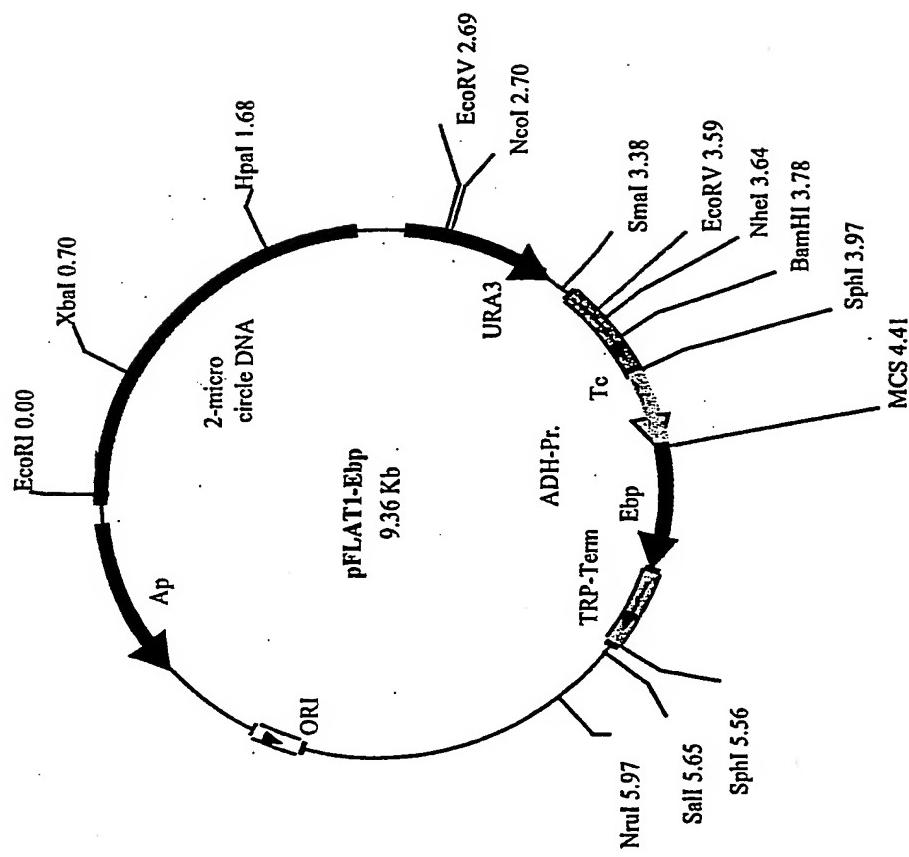


Abbildung 5c

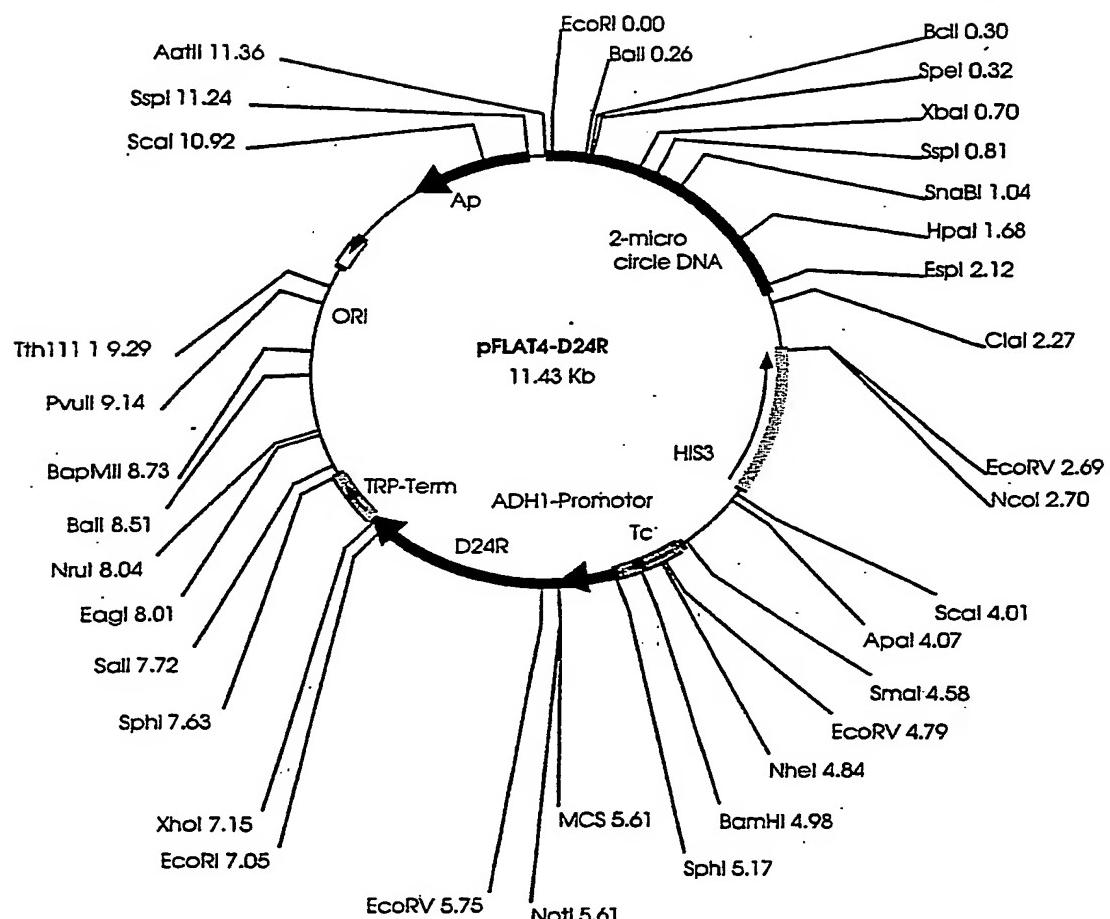


Abbildung 5d

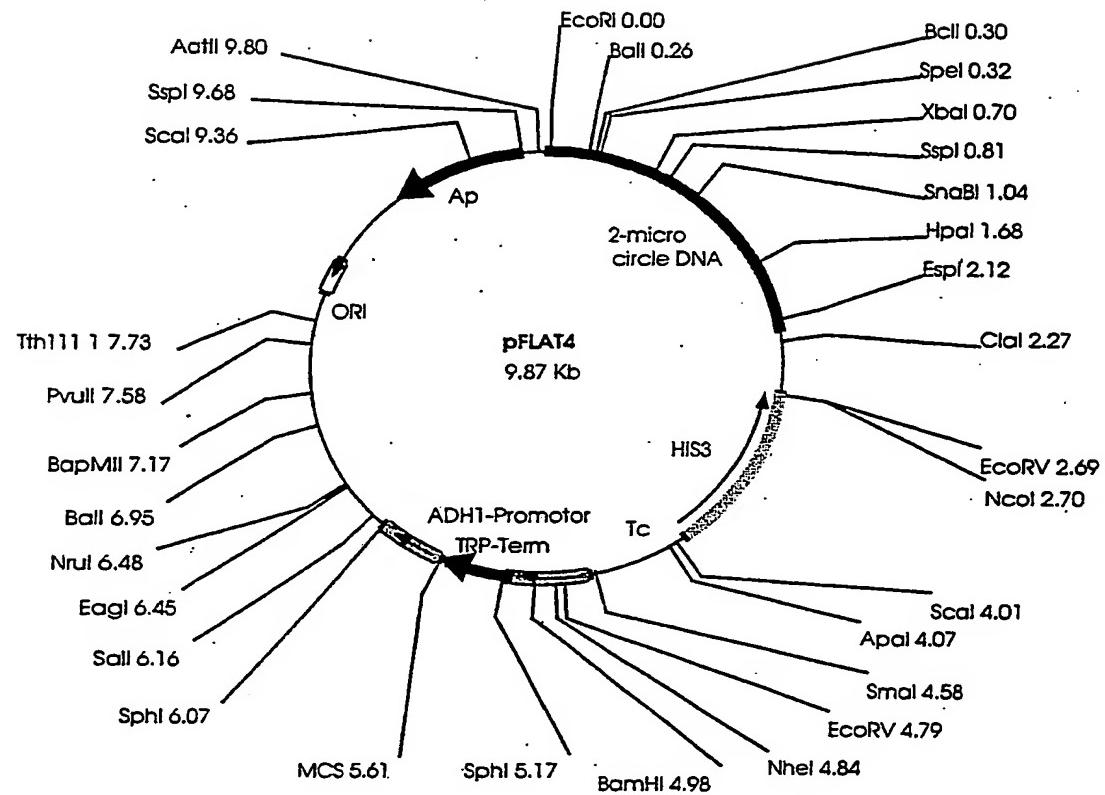


Abbildung 6

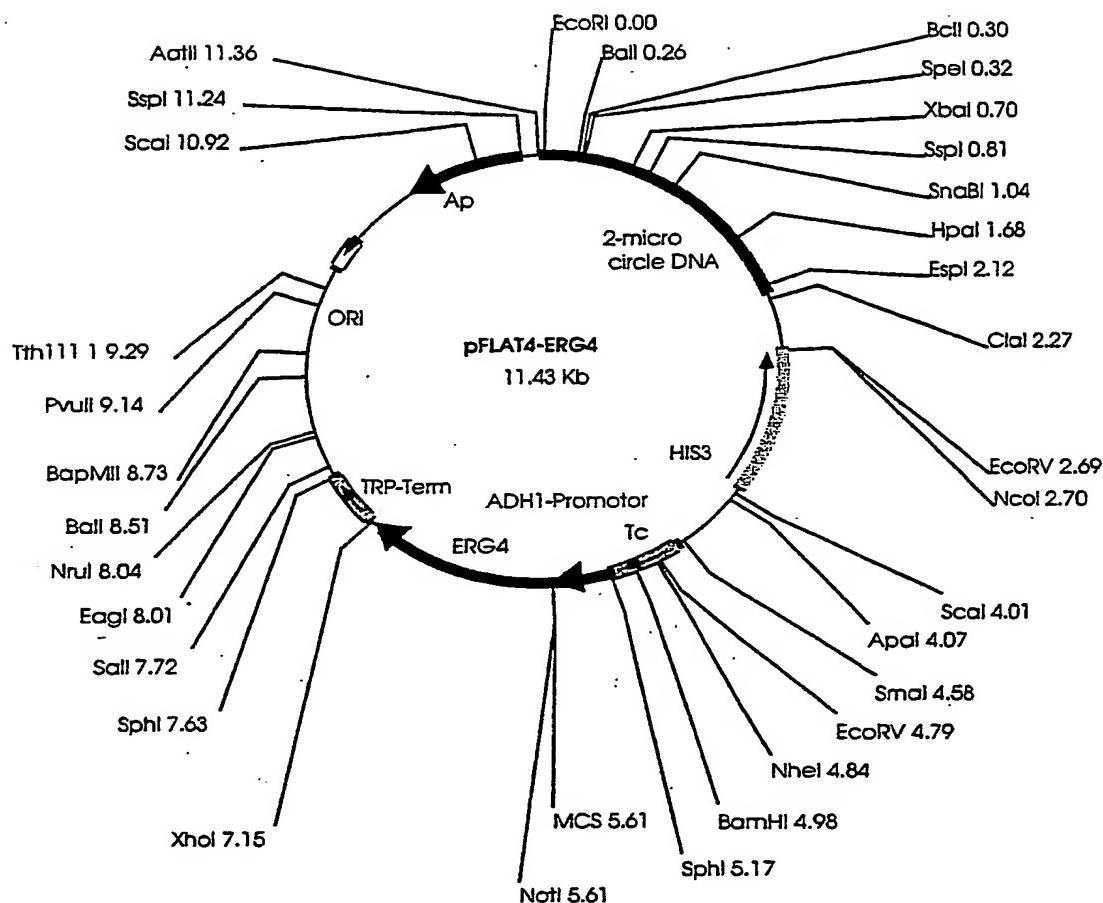


Abbildung 7

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Verfahren zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol
und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder
Folgeprodukten in transgenen Organismen

<130> 0050

<140>

<141>

<160> 60

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 693

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(693)

<400> 1

atg acc acc aat acg gtc ccc ttg cac ccg tac tgg ccc agg cac ctg	48
Met Thr Thr Asn Thr Val Pro Leu His Pro Tyr Trp Pro Arg His Leu	
1 5 10 15	

aag ctg gac aac ttc gtg cct aat gac ctc ccg act tcg cat atc ctg	96
Lys Leu Asp Asn Phe Val Pro Asn Asp Leu Pro Thr Ser His Ile Leu	
20 25 30	

gtt ggc ctc ttc tcc atc tct ggg ggc cta att gtg atc acg tgg ctg	144
Val Gly Leu Phe Ser Ile Ser Gly Gly Leu Ile Val Ile Thr Trp Leu	
35 40 45	

ttg tct agc cga gct tcc gtc cca ctt gga gct ggg cgg cga ctg	192
Leu Ser Ser Arg Ala Ser Val Val Pro Leu Gly Ala Gly Arg Arg Leu	
50 55 60	

gcc ttg tgc tgg ttt gct gtg tgt acc ttc att cac ctt gtg atc gag	240
Ala Leu Cys Trp Phe Ala Val Cys Thr Phe Ile His Leu Val Ile Glu	
65 70 75 80	

ggc tgg ttc tct ctc tac aat ggc atc ctt tta gaa gac caa gcc ttc	288
Gly Trp Phe Ser Leu Tyr Asn Gly Ile Leu Leu Glu Asp Gln Ala Phe	
85 90 95	

tta tcc caa ctc tgg aaa gag tat tcc aag gga gat agc cga tat atc	336
Leu Ser Gln Leu Trp Lys Glu Tyr Ser Lys Gly Asp Ser Arg Tyr Ile	
100 105 110	

ctt agt gac agc ttc gtc gtc tgt atg gag act gtc aca gct tgt ctc	384
Leu Ser Asp Ser Phe Val Val Cys Met Glu Thr Val Thr Ala Cys Leu	

115

120

125

tgg gga cca ctc agc cta tgg gta gtg att gcc ttt ctc cgc caa cag 432
Trp Gly Pro Leu Ser Leu Trp Val Val Ile Ala Phe Leu Arg Gln Gln
130 135 140

ccc ttc cgc ttt gtc cta cag ctt gtg gtg tct atg ggc cag ata tac 480
Pro Phe Arg Phe Val Leu Gln Leu Val Val Ser Met Gly Gln Ile Tyr
145 150 155 160

ggg gat gtg ctg tac ttc ctg aca gag cta cac gaa gga ctc cag cat 528
Gly Asp Val Leu Tyr Phe Leu Thr Glu Leu His Glu Gly Leu Gln His
165 170 175

ggg gag ata ggc cac ccc gtt tat ttc tgg ttc tat ttt gtt ttc ctg 576
Gly Glu Ile Gly His Pro Val Tyr Phe Trp Phe Tyr Phe Val Phe Leu
180 185 190

aat gct gta tgg ttg gtg ata cca agc atc ctt gtg ctt gat gcc ata 624
Asn Ala Val Trp Leu Val Ile Pro Ser Ile Leu Val Leu Asp Ala Ile
195 200 205

aag cat ctc act agt gcc cag agc gtg ctg gac agc aaa gtc atg aaa 672
Lys His Leu Thr Ser Ala Gln Ser Val Leu Asp Ser Lys Val Met Lys
210 215 220

att aag agc aag cat aac taa 693
Ile Lys Ser Lys His Asn
225 230

<210> 2
<211> 230
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2
Met Thr Thr Asn Thr Val Pro Leu His Pro Tyr Trp Pro Arg His Leu
1 5 10 15

Lys Leu Asp Asn Phe Val Pro Asn Asp Leu Pro Thr Ser His Ile Leu
20 25 30

Val Gly Leu Phe Ser Ile Ser Gly Gly Leu Ile Val Ile Thr Trp Leu
35 40 45

Leu Ser Ser Arg Ala Ser Val Val Pro Leu Gly Ala Gly Arg Arg Leu
50 55 60

Ala Leu Cys Trp Phe Ala Val Cys Thr Phe Ile His Leu Val Ile Glu
65 70 75 80

Gly Trp Phe Ser Leu Tyr Asn Gly Ile Leu Leu Glu Asp Gln Ala Phe
85 90 95

Leu Ser Gln Leu Trp Lys Glu Tyr Ser Lys Gly Asp Ser Arg Tyr Ile
100 105 110

Leu	Ser	Asp	Ser	Phe	Val	Val	Cys	Met	Glu	Thr	Val	Thr	Ala	Cys	Leu	
115					120						125					
Trp	Gly	Pro	Leu	Ser	Leu	Trp	Val	Val	Ile	Ala	Phe	Leu	Arg	Gln	Gln	
130					135						140					
Pro	Phe	Arg	Phe	Val	Leu	Gln	Leu	Val	Val	Ser	Met	Gly	Gln	Ile	Tyr	
145					150					155					160	
Gly	Asp	Val	Leu	Tyr	Phe	Leu	Thr	Glu	Leu	His	Glu	Gly	Leu	Gln	His	
					165			170							175	
Gly	Glu	Ile	Gly	His	Pro	Val	Tyr	Phe	Trp	Phe	Tyr	Phe	Val	Phe	Leu	
					180			185							190	
Asn	Ala	Val	Trp	Leu	Val	Ile	Pro	Ser	Ile	Leu	Val	Leu	Asp	Ala	Ile	
					195			200							205	
Lys	His	Leu	Thr	Ser	Ala	Gln	Ser	Val	Leu	Asp	Ser	Lys	Val	Met	Lys	
					210			215				220				
Ile	Lys	Ser	Lys	His	Asn											
	225				230											
<210> 3																
<211> 693																
<212> DNA																
<213> Homo sapiens																
<220>																
<221> CDS																
<222> (1)..(693)																
<400> 3																
atg	act	acc	aac	gcg	ggc	ccc	ttg	cac	cca	tac	tgg	cct	cag	cac	cta	48
Met	Thr	Thr	Asn	Ala	Gly	Pro	Leu	His	Pro	Tyr	Trp	Pro	Gln	His	Leu	
1						5				10					15	
aga	ctg	gac	aac	ttt	gta	cct	aat	gac	cgc	ccc	acc	tgg	cat	ata	ctg	96
Arg	Leu	Asp	Asn	Phe	Val	Pro	Asn	Asp	Arg	Pro	Thr	Trp	His	Ile	Leu	
						20				25					30	
gct	ggc	ctc	ttc	tct	gtc	aca	ggg	gtc	tta	gtc	gtg	acc	aca	tgg	ctg	144
Ala	Gly	Leu	Phe	Ser	Val	Thr	Gly	Val	Leu	Val	Val	Thr	Thr	Trp	Leu	
						35			40						45	
ttg	tca	ggt	cgt	gct	gcg	gtt	gtc	cca	ttg	ggg	act	tgg	cgg	cga	ctg	192
Leu	Ser	Gly	Arg	Ala	Ala	Val	Val	Pro	Leu	Gly	Thr	Trp	Arg	Arg	Leu	
						50			55						60	
tcc	ctg	tgc	tgg	ttt	gca	gtg	tgt	ggg	ttc	att	cac	ctg	gtg	atc	gag	240
Ser	Leu	Cys	Trp	Phe	Ala	Val	Cys	Gly	Phe	Ile	His	Leu	Val	Ile	Glu	
						65			70			75			80	
ggc	tgg	ttc	gtt	ctc	tac	tac	gaa	gac	ctg	ctt	gga	gac	caa	gcc	ttc	288

Gly Trp Phe Val Leu Tyr Tyr Glu Asp Leu Leu Gly Asp Gln Ala Phe			
85	90	95	
tta tct caa ctc tgg aaa gag tat gcc aag gga gac agc cga tac atc			336
Leu Ser Gln Leu Trp Lys Glu Tyr Ala Lys Gly Asp Ser Arg Tyr Ile			
100	105	110	
ctg ggt gac aac ttc aca gtg tgc atg gaa acc atc aca gct tgc ctg			384
Leu Gly Asp Asn Phe Thr Val Cys Met Glu Thr Ile Thr Ala Cys Leu			
115	120	125	
tgg gga cca ctc agc ctg tgg gtg atc gcc ttt ctc cgc cag cat			432
Trp Gly Pro Leu Ser Leu Trp Val Val Ile Ala Phe Leu Arg Gln His			
130	135	140	
ccc ctc cgc ttc att cta cag ctt gtg gtc tct gtg ggc cag atc tat			480
Pro Leu Arg Phe Ile Leu Gln Leu Val Val Ser Val Gly Gln Ile Tyr			
145	150	155	160
ggg gat gtg ctc tac ttc ctg aca gag cac cgc gac gga ttc cag cac			528
Gly Asp Val Leu Tyr Phe Leu Thr Glu His Arg Asp Gly Phe Gln His			
165	170	175	
gga gag ctg ggc cac cct ctc tac ttc tgg ttt tac ttt gtc ttc atg			576
Gly Glu Leu Gly His Pro Leu Tyr Phe Trp Phe Tyr Phe Val Phe Met			
180	185	190	
aat gcc ctg tgg ctg gtg ctc gca gtc ctt gtg ctt gat gct gtg			624
Asn Ala Leu Trp Leu Val Leu Pro Gly Val Leu Val Leu Asp Ala Val			
195	200	205	
aag cac ctc act cat gcc cag agc acg ctg gat gcc aag gcc aca aaa			672
Lys His Leu Thr His Ala Gln Ser Thr Leu Asp Ala Lys Ala Thr Lys			
210	215	220	
gcc aag agc aag aag aac tga			693
Ala Lys Ser Lys Lys Asn			
225	230		
<210> 4			
<211> 230			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 4			
Met Thr Thr Asn Ala Gly Pro Leu His Pro Tyr Trp Pro Gln His Leu			
1 5 10 15			
Arg Leu Asp Asn Phe Val Pro Asn Asp Arg Pro Thr Trp His Ile Leu			
20 25 30			
Ala Gly Leu Phe Ser Val Thr Gly Val Leu Val Val Thr Thr Trp Leu			
35 40 45			
Leu Ser Gly Arg Ala Ala Val Val Pro Leu Gly Thr Trp Arg Arg Leu			
50 55 60			

Ser Leu Cys Trp Phe Ala Val Cys Gly Phe Ile His Leu Val Ile Glu
 65 70 75 80

Gly Trp Phe Val Leu Tyr Tyr Glu Asp Leu Leu Gly Asp Gln Ala Phe
 85 90 95

Leu Ser Gln Leu Trp Lys Glu Tyr Ala Lys Gly Asp Ser Arg Tyr Ile
 100 105 110

Leu Gly Asp Asn Phe Thr Val Cys Met Glu Thr Ile Thr Ala Cys Leu
 115 120 125

Trp Gly Pro Leu Ser Leu Trp Val Val Ile Ala Phe Leu Arg Gln His
 130 135 140

Pro Leu Arg Phe Ile Leu Gln Leu Val Val Ser Val Gly Gln Ile Tyr
 145 150 155 160

Gly Asp Val Leu Tyr Phe Leu Thr Glu His Arg Asp Gly Phe Gln His
 165 170 175

Gly Glu Leu Gly His Pro Leu Tyr Phe Trp Phe Tyr Phe Val Phe Met
 180 185 190

Asn Ala Leu Trp Leu Val Leu Pro Gly Val Leu Val Leu Asp Ala Val
 195 200 205

Lys His Leu Thr His Ala Gln Ser Thr Leu Asp Ala Lys Ala Thr Lys
 210 215 220

Ala Lys Ser Lys Lys Asn
 225 230

<210> 5
 <211> 669
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(669)

<400> 5
 atg aag ttt ttc cca ctc ctt ttg ttg att ggt gtt gta ggc tac att 48
 Met Lys Phe Phe Pro Leu Leu Leu Ile Gly Val Val Gly Tyr Ile
 1 5 10 15

atg aac gta ttg ttc act acc tgg ttg cca acc aat tac atg ttc gat 96
 Met Asn Val Leu Phe Thr Trp Leu Pro Thr Asn Tyr Met Phe Asp
 20 25 30

cca aaa act ttg aac gaa ata tgt aac tcg gtg att agc aaa cac aac 144
 Pro Lys Thr Leu Asn Glu Ile Cys Asn Ser Val Ile Ser Lys His Asn
 35 40 45

gca gca gaa ggt tta tcc act gaa gac ctg tta cag gat gtc aga gac	192
Ala Ala Glu Gly Leu Ser Thr Glu Asp Leu Leu Gln Asp Val Arg Asp	
50 55 60	
gca ctt gcc tct cat tac ggg gac gaa tac atc aac agg tac gtc aaa	240
Ala Leu Ala Ser His Tyr Gly Asp Glu Tyr Ile Asn Arg Tyr Val Lys	
65 70 75 80	
gaa gaa tgg gtc ttc aac aat gct ggt ggt gcg atg ggc caa atg atc	288
Glu Glu Trp Val Phe Asn Asn Ala Gly Gly Ala Met Gly Gln Met Ile	
85 90 95	
atc cta cac gct tcc gta tcc gag tac tta att cta ttc gga acc gct	336
Ile Leu His Ala Ser Val Ser Glu Tyr Leu Ile Leu Phe Gly Thr Ala	
100 105 110	
gtt ggt act gaa ggg cac aca ggt gtt cac ttt gct gac gac tat ttt	384
Val Gly Thr Glu Gly His Thr Gly Val His Phe Ala Asp Asp Tyr Phe	
115 120 125	
acc atc tta cat ggt acg caa atc gca gca ttg cca tat gcc act gaa	432
Thr Ile Leu His Gly Thr Gln Ile Ala Ala Leu Pro Tyr Ala Thr Glu	
130 135 140	
gcc gaa gtt tac act cct ggt atg act cat cac ttg aag aag gga tac	480
Ala Glu Val Tyr Thr Pro Gly Met Thr His His Leu Lys Lys Gly Tyr	
145 150 155 160	
gcc aag caa tac agc atg cca ggt ggt tcc ttt gcc ctt gaa ttg gct	528
Ala Lys Gln Tyr Ser Met Pro Gly Gly Ser Phe Ala Leu Glu Leu Ala	
165 170 175	
caa ggc tgg att cca tgt atg ttg cca ttc ggg ttt ttg gac act ttc	576
Gln Gly Trp Ile Pro Cys Met Leu Pro Phe Gly Phe Leu Asp Thr Phe	
180 185 190	
tcc agt act ctt gat tta tac act cta tat aga act gtc tac ctg act	624
Ser Ser Thr Leu Asp Leu Tyr Thr Leu Tyr Arg Thr Val Tyr Leu Thr	
195 200 205	
gcc agg gac atg ggt aag aac ttg ttg caa aac aaa aag ttc taa	669
Ala Arg Asp Met Gly Lys Asn Leu Leu Gln Asn Lys Lys Phe	
210 215 220	

<210> 6
<211> 222
<212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 6
Met Lys Phe Phe Pro Leu Leu Leu Ile Gly Val Val Gly Tyr Ile
1 5 10 15

Met Asn Val Leu Phe Thr Thr Trp Leu Pro Thr Asn Tyr Met Phe Asp
20 25 30

Pro Lys Thr Leu Asn Glu Ile Cys Asn Ser Val Ile Ser Lys His Asn
 35 40 45

Ala Ala Glu Gly Leu Ser Thr Glu Asp Leu Leu Gln Asp Val Arg Asp
 50 55 60

Ala Leu Ala Ser His Tyr Gly Asp Glu Tyr Ile Asn Arg Tyr Val Lys
 65 70 75 80

Glu Glu Trp Val Phe Asn Asn Ala Gly Gly Ala Met Gly Gln Met Ile
 85 90 95

Ile Leu His Ala Ser Val Ser Glu Tyr Leu Ile Leu Phe Gly Thr Ala
 100 105 110

Val Gly Thr Glu Gly His Thr Gly Val His Phe Ala Asp Asp Tyr Phe
 115 120 125

Thr Ile Leu His Gly Thr Gln Ile Ala Ala Leu Pro Tyr Ala Thr Glu
 130 135 140

Ala Glu Val Tyr Thr Pro Gly Met Thr His His Leu Lys Lys Gly Tyr
 145 150 155 160

Ala Lys Gln Tyr Ser Met Pro Gly Gly Ser Phe Ala Leu Glu Leu Ala
 165 170 175

Gln Gly Trp Ile Pro Cys Met Leu Pro Phe Gly Phe Leu Asp Thr Phe
 180 185 190

Ser Ser Thr Leu Asp Leu Tyr Thr Leu Tyr Arg Thr Val Tyr Leu Thr
 195 200 205

Ala Arg Asp Met Gly Lys Asn Leu Leu Gln Asn Lys Lys Phe
 210 215 220

<210> 7
 <211> 900
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(900)

<400> 7
 atg gac ctg gtt ctc agt gcc gcc gat tac tac ttc ttc act ccg tat 48
 Met Asp Leu Val Leu Ser Ala Ala Asp Tyr Tyr Phe Phe Thr Pro Tyr
 1 5 10 15

gta tat cca gcc acg tgg ccc gag gac aac atc atc cga caa act att 96
 Val Tyr Pro Ala Thr Trp Pro Glu Asp Asn Ile Arg Gln Thr Ile
 20 25 30

agc ctc ctg att gtc aca aac ctg ggt gct tac att ctc tac ttc ttc 144
 Ser Leu Leu Ile Val Thr Asn Leu Gly Ala Tyr Ile Leu Tyr Phe Phe

35	40	45	
tgt gca acc ctc agc tat tat ttt gtc tat gat cat tcc tta atg aaa Cys Ala Thr Leu Ser Tyr Tyr Phe Val Tyr Asp His Ser Leu Met Lys 50	55	60	192
cac cca cag ttt tta aag aac caa gtc tcg cgt gag atc gtg ttc act His Pro Gln Phe Leu Lys Asn Gln Val Ser Arg Glu Ile Val Phe Thr 65	70	75	240
gtc aag tct ttg cct tgg atc agc atc ccc acc gtc tca cta ttc ctg Val Lys Ser Leu Pro Trp Ile Ser Ile Pro Thr Val Ser Leu Phe Leu 85	90	95	288
ctg gag ctg agg ggt tac agc aaa ctc tac gat gac atc gga gac ttt Leu Glu Leu Arg Gly Tyr Ser Lys Leu Tyr Asp Asp Ile Gly Asp Phe 100	105	110	336
cca aat ggc tgg att cat ctc atg gtt agc gtc gta tcc ttc ctc ttt Pro Asn Gly Trp Ile His Leu Met Val Ser Val Val Ser Phe Leu Phe 115	120	125	384
ttc aca gac atg ttg atc tac agg att cat agg ggc ctg cac cac aga Phe Thr Asp Met Leu Ile Tyr Arg Ile His Arg Gly Leu His His Arg 130	135	140	432
ctg gtc tac aag cgc ata cat aaa cca cat cat att tgg aag atc ccc Leu Val Tyr Lys Arg Ile His Lys Pro His His Ile Trp Lys Ile Pro 145	150	155	480
acg ccg ttt gca agt cat gct ttt cac cct gtg gac ggc ttc ctt cag Thr Pro Phe Ala Ser His Ala Phe His Pro Val Asp Gly Phe Leu Gln 165	170	175	528
agt ctg cct tac cat ata tac ccc ttt gtc ttt cca ctg cac aag gtg Ser Leu Pro Tyr His Ile Tyr Pro Phe Val Phe Pro Leu His Lys Val 180	185	190	576
gtc tac tta ggt tta tat gtc ttg gtt aat gtc tgg aca att tct att Val Tyr Leu Gly Leu Tyr Val Leu Val Asn Val Trp Thr Ile Ser Ile 195	200	205	624
cat gat ggt gat ttt cgg gtt ccc cag atc tta agg cca ttt att aac His Asp Gly Asp Phe Arg Val Pro Gln Ile Leu Arg Pro Phe Ile Asn 210	215	220	672
ggg tca gct cac cac aca gac cac cac atg ttc ttt gac tat aac tat Gly Ser Ala His His Thr Asp His His Met Phe Phe Asp Tyr Asn Tyr 225	230	235	720
gga cag tat ttc aca ttg tgg gat aga att gga ggc tct ttt aaa cat Gly Gln Tyr Phe Thr Leu Trp Asp Arg Ile Gly Gly Ser Phe Lys His 245	250	255	768
cct tcc tct ttt gaa ggg aaa gga cca cat agt tac gtg aag aac atg Pro Ser Ser Phe Glu Gly Lys Gly Pro His Ser Tyr Val Lys Asn Met 260	265	270	816

aca gaa aaa gaa tct aac agc ttt gca gaa aac ggc tgt aaa ggc aaa 864
 Thr Glu Lys Glu Ser Asn Ser Phe Ala Glu Asn Gly Cys Lys Gly Lys
 275 280 285

aaa gta agc aat gga gag ttt aca aag aat aag tag 900
 Lys Val Ser Asn Gly Glu Phe Thr Lys Asn Lys
 290 295 300

<210> 8
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8
 Met Asp Leu Val Leu Ser Ala Ala Asp Tyr Tyr Phe Phe Thr Pro Tyr
 1 5 10 15

Val Tyr Pro Ala Thr Trp Pro Glu Asp Asn Ile Ile Arg Gln Thr Ile
 20 25 30

Ser Leu Leu Ile Val Thr Asn Leu Gly Ala Tyr Ile Leu Tyr Phe Phe
 35 40 45

Cys Ala Thr Leu Ser Tyr Tyr Phe Val Tyr Asp His Ser Leu Met Lys
 50 55 60

His Pro Gln Phe Leu Lys Asn Gln Val Ser Arg Glu Ile Val Phe Thr
 65 70 75 80

Val Lys Ser Leu Pro Trp Ile Ser Ile Pro Thr Val Ser Leu Phe Leu
 85 90 95

Leu Glu Leu Arg Gly Tyr Ser Lys Leu Tyr Asp Asp Ile Gly Asp Phe
 100 105 110

Pro Asn Gly Trp Ile His Leu Met Val Ser Val Val Ser Phe Leu Phe
 115 120 125

Phe Thr Asp Met Leu Ile Tyr Arg Ile His Arg Gly Leu His His Arg
 130 135 140

Leu Val Tyr Lys Arg Ile His Lys Pro His His Ile Trp Lys Ile Pro
 145 150 155 160

Thr Pro Phe Ala Ser His Ala Phe His Pro Val Asp Gly Phe Leu Gln
 165 170 175

Ser Leu Pro Tyr His Ile Tyr Pro Phe Val Phe Pro Leu His Lys Val
 180 185 190

Val Tyr Leu Gly Leu Tyr Val Leu Val Asn Val Trp Thr Ile Ser Ile
 195 200 205

His Asp Gly Asp Phe Arg Val Pro Gln Ile Leu Arg Pro Phe Ile Asn
 210 215 220

Gly Ser Ala His His Thr Asp His His Met Phe Phe Asp Tyr Asn Tyr
 225 230 235 240

Gly Gln Tyr Phe Thr Leu Trp Asp Arg Ile Gly Gly Ser Phe Lys His
 245 250 255

Pro Ser Ser Phe Glu Gly Lys Gly Pro His Ser Tyr Val Lys Asn Met
 260 265 270

Thr Glu Lys Glu Ser Asn Ser Phe Ala Glu Asn Gly Cys Lys Gly Lys
 275 280 285

Lys Val Ser Asn Gly Glu Phe Thr Lys Asn Lys
 290 295

<210> 9

<211> 900

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(900)

<400> 9

atg gat ctt gta ctc cgt gtt gca gat tac tat ttt ttt aca cca tac	48
Met Asp Leu Val Leu Arg Val Ala Asp Tyr Tyr Phe Phe Thr Pro Tyr	
1 5 10 15	

gtg tat cca gcc aca tgg cca gaa gat gac atc ttc cga caa gct att	96
Val Tyr Pro Ala Thr Trp Pro Glu Asp Asp Ile Phe Arg Gln Ala Ile	
20 25 30	

agt ctt ctg att gta aca aat gtt ggt gct tac atc ctt tat ttc ttc	144
Ser Leu Leu Ile Val Thr Asn Val Gly Ala Tyr Ile Leu Tyr Phe Phe	
35 40 45	

tgt gca aca ctg agc tat tat ttt gtc ttc gat cat gca tta atg aaa	192
Cys Ala Thr Leu Ser Tyr Tyr Phe Val Phe Asp His Ala Leu Met Lys	
50 55 60	

cat cca caa ttt tta aag aat caa gtc cgt cga gag att aag ttt act	240
His Pro Gln Phe Leu Lys Asn Gln Val Arg Arg Glu Ile Lys Phe Thr	
65 70 75 80	

gtc cag gca ttg cca tgg ata agt att ctt act gtt gca ctg ttc ttg	288
Val Gln Ala Leu Pro Trp Ile Ser Ile Leu Thr Val Ala Leu Phe Leu	
85 90 95	

ctg gag ata aga ggt tac agc aaa tta cat gat gac cta gga gag ttt	336
Leu Glu Ile Arg Gly Tyr Ser Lys Leu His Asp Asp Leu Gly Glu Phe	
100 105 110	

cca tat gga ttg ttt gaa ctt gtc gtt agt ata ata tct ttc ctc ttt	384
Pro Tyr Gly Leu Phe Glu Leu Val Val Ser Ile Ile Ser Phe Leu Phe	

115

120

125

ttc act gac atg ttc atc tac tgg att cac aga ggc ctt cat cat aga 432
 Phe Thr Asp Met Phe Ile Tyr Trp Ile His Arg Gly Leu His His Arg
 130 135 140

ctg gta tat aag cgc cta cat aaa cct cac cat att tgg aag att cct 480
 Leu Val Tyr Lys Arg Leu His Lys Pro His His Ile Trp Lys Ile Pro
 145 150 155 160

act cca ttt gca agt cat gct ttt cac cct att gat ggc ttt ctt cag 528
 Thr Pro Phe Ala Ser His Ala Phe His Pro Ile Asp Gly Phe Leu Gln
 165 170 175

agt cta cct tac cat ata tac cct ttt atc ttt cca tta cac aag gtg 576
 Ser Leu Pro Tyr His Ile Tyr Pro Phe Ile Phe Pro Leu His Lys Val
 180 185 190

gtt tat tta agt ctg tac atc ttg gtt aat atc tgg aca att tcc att 624
 Val Tyr Leu Ser Leu Tyr Ile Leu Val Asn Ile Trp Thr Ile Ser Ile
 195 200 205

cat gac ggt gat ttt cgt gtc ccc caa atc tta cag cca ttt att aat 672
 His Asp Gly Asp Phe Arg Val Pro Gln Ile Leu Gln Pro Phe Ile Asn
 210 215 220

ggc tca gct cat cat aca gac cac cat atg ttc ttt gac tat aat tat 720
 Gly Ser Ala His His Thr Asp His His Met Phe Phe Asp Tyr Asn Tyr
 225 230 235 240

gga caa tat ttc act ttg tgg gat agg att ggc ggc tca ttc aaa aat 768
 Gly Gln Tyr Phe Thr Leu Trp Asp Arg Ile Gly Gly Ser Phe Lys Asn
 245 250 255

cct tca tcc ttt gag ggg aag gga ccg ctc agt tat gtg aag gag atg 816
 Pro Ser Ser Phe Glu Gly Lys Gly Pro Leu Ser Tyr Val Lys Glu Met
 260 265 270

aca gag gga aag cgc agc agc cct tca gga aat ggc tgt aag aat gaa 864
 Thr Glu Gly Lys Arg Ser Ser Pro Ser Gly Asn Gly Cys Lys Asn Glu
 275 280 285

aaa tta ttc aat gga gag ttt aca aag act gaa tag 900
 Lys Leu Phe Asn Gly Glu Phe Thr Lys Thr Glu
 290 295 300

<210> 10

<211> 299

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Asp Leu Val Leu Arg Val Ala Asp Tyr Tyr Phe Phe Thr Pro Tyr
 1 5 10 15

Val Tyr Pro Ala Thr Trp Pro Glu Asp Asp Ile Phe Arg Gln Ala Ile

20

25

30

Ser Leu Leu Ile Val Thr Asn Val Gly Ala Tyr Ile Leu Tyr Phe Phe
 35 40 45

Cys Ala Thr Leu Ser Tyr Tyr Phe Val Phe Asp His Ala Leu Met Lys
 50 55 60

His Pro Gln Phe Leu Lys Asn Gln Val Arg Arg Glu Ile Lys Phe Thr
 65 70 75 80

Val Gln Ala Leu Pro Trp Ile Ser Ile Leu Thr Val Ala Leu Phe Leu
 85 90 95

Leu Glu Ile Arg Gly Tyr Ser Lys Leu His Asp Asp Leu Gly Glu Phe
 100 105 110

Pro Tyr Gly Leu Phe Glu Leu Val Val Ser Ile Ile Ser Phe Leu Phe
 115 120 125

Phe Thr Asp Met Phe Ile Tyr Trp Ile His Arg Gly Leu His His Arg
 130 135 140

Leu Val Tyr Lys Arg Leu His Lys Pro His His Ile Trp Lys Ile Pro
 145 150 155 160

Thr Pro Phe Ala Ser His Ala Phe His Pro Ile Asp Gly Phe Leu Gln
 165 170 175

Ser Leu Pro Tyr His Ile Tyr Pro Phe Ile Phe Pro Leu His Lys Val
 180 185 190

Val Tyr Leu Ser Leu Tyr Ile Leu Val Asn Ile Trp Thr Ile Ser Ile
 195 200 205

His Asp Gly Asp Phe Arg Val Pro Gln Ile Leu Gln Pro Phe Ile Asn
 210 215 220

Gly Ser Ala His His Thr Asp His His Met Phe Phe Asp Tyr Asn Tyr
 225 230 235 240

Gly Gln Tyr Phe Thr Leu Trp Asp Arg Ile Gly Gly Ser Phe Lys Asn
 245 250 255

Pro Ser Ser Phe Glu Gly Lys Gly Pro Leu Ser Tyr Val Lys Glu Met
 260 265 270

Thr Glu Gly Lys Arg Ser Ser Pro Ser Gly Asn Gly Cys Lys Asn Glu
 275 280 285

Lys Leu Phe Asn Gly Glu Phe Thr Lys Thr Glu
 290 295

<210> 11
 <211> 1098
 <212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1098)

<400> 11

```

atg gat ttg.gtc tta gaa gtc gct gac cat tat gtc tta gac gac ttg 48
Met Asp Leu Val Leu Glu Val Ala Asp His Tyr Val Leu Asp Asp Leu
1           5           10          15

```

tac gct aaa gtt ctg ccc gct tcg ttg gca gct aat att cct gtc aag 96
Tyr Ala Lys Val Leu Pro Ala Ser Leu Ala Ala Asn Ile Pro Val Lys
 20 25 30

tgg cag aaa ttg cta ggg ttg aac agt ggg ttc agc aat tct acg att 144
Trp Gln Lys Leu Leu Gly Leu Asn Ser Gly Phe Ser Asn Ser Thr Ile
35 40 45

ttg cag gag act ttg aac tcc aag aat gcc gtc aaa gaa tgt aga agg 192
 Leu Gln Glu Thr Leu Asn Ser Lys Asn Ala Val Lys Glu Cys Arg Arg
 50 55 60

ttc tac ggg cag gtg cca ttc ctg ttt gat atg tcg acg acg tct ttt 240
 Phe Tyr Gly Gln Val Pro Phe Leu Phe Asp Met Ser Thr Thr Ser Phe
 65 70 75 80

gca tcg cta ttg cct cgt tcc agc atc ttg aga gaa ttc ctc tca cta 288
 Ala Ser Leu Leu Pro Arg Ser Ser Ile Leu Arg Glu Phe Leu Ser Leu
 85 90 95

tgg gtt att gtt acg atc ttt ggt tta cta ctt tac tta ttc acg gct 336
Trp Val Ile Val Thr Ile Phe Gly Leu Leu Leu Tyr Leu Phe Thr Ala
100 105 110

agt ctc agc tac gtg ttt gtg ttt gac aag tcg att ttc aac cat cct 384
 Ser Leu Ser Tyr Val Phe Val Phe Asp Lys Ser Ile Phe Asn His Pro
 115 120 125

```

cgt tac ttg aaa aac caa atg gca atg gaa atc aag ttg gca gtc agt 432
Arg Tyr Leu Lys Asn Gln Met Ala Met Glu Ile Lys Leu Ala Val Ser
          130           135           140

```

gct atc cca tgg atg tcg atg ttg acc gtt cca tgg ttt gtt atg gaa 480
 Ala Ile Pro Trp Met Ser Met Leu Thr Val Pro Trp Phe Val Met Glu
 145 150 155 160

ttg aac ggc cat tct aaa cta tac atg aag att gat tat gaa aac cac 528
 Leu Asn Gly His Ser Lys Leu Tyr Met Lys Ile Asp Tyr Glu Asn His
 165 170 175

gg t gta agg aag ctc att atc gag tac ttc act ttc atc ttt ttc act 576
 Gly Val Arg Lys Leu Ile Ile Glu Tyr Phe Thr Phe Ile Phe Phe Thr
 180 185 190

gat tgc ggt gtg tat tta gcg cac aga tgg ttg cat tgg cca agg gtc 624
Asp Cys Gly Val Tyr Leu Ala His Arg Trp Leu His Trp Pro Arg Val

195

200

205

tac cgt gct ctg cac aag cct cat cac aag tgg ctg gtc tgc aca cct 672
 Tyr Arg Ala Leu His Lys Pro His His Lys Trp Leu Val Cys Thr Pro
 210 215 220

ttc gca tct cat tct ttc cat cct gta gac ggg ttt ttg caa tcc atc 720
 Phe Ala Ser His Ser Phe His Pro Val Asp Gly Phe Leu Gln Ser Ile
 225 230 235 240

tcg tac cac atc tac cca ttg att ctg cca tta cac aag gtt tct tat 768
 Ser Tyr His Ile Tyr Pro Leu Ile Leu Pro Leu His Lys Val Ser Tyr
 245 250 255

ttg att ctg ttc act ttt gtt aac ttt tgg act gtt atg att cat gac 816
 Leu Ile Leu Phe Thr Phe Val Asn Phe Trp Thr Val Met Ile His Asp
 260 265 270

ggt caa tac cta tca aac aat cct gcc gtc aac ggt act gcc tgc cac 864
 Gly Gln Tyr Leu Ser Asn Asn Pro Ala Val Asn Gly Thr Ala Cys His
 275 280 285

acg gtt cac cat cta tat ttc aac tac aac tac ggt caa ttc acc act 912
 Thr Val His His Leu Tyr Phe Asn Tyr Asn Tyr Gly Gln Phe Thr Thr
 290 295 300

ctg tgg gac aga cta ggg ggt tct tac cgt aga cca gat gac tca ttg 960
 Leu Trp Asp Arg Leu Gly Gly Ser Tyr Arg Arg Pro Asp Asp Ser Leu
 305 310 315 320

ttt gat cct aag tta aga gat gct aag gag acc tgg gac gct caa gtt 1008
 Phe Asp Pro Lys Leu Arg Asp Ala Lys Glu Thr Trp Asp Ala Gln Val
 325 330 335

aag gaa gtt gaa cat ttc atc aag gag gtc gaa ggt gat gat aat gat 1056
 Lys Glu Val Glu His Phe Ile Lys Glu Val Glu Gly Asp Asp Asn Asp
 340 345 350

aga atc tat gaa aac gac cca aat acc aag aag aac aac tga 1098
 Arg Ile Tyr Glu Asn Asp Pro Asn Thr Lys Lys Asn Asn
 355 360 365

<210> 12

<211> 365

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 12

Met Asp Leu Val Leu Glu Val Ala Asp His Tyr Val Leu Asp Asp Leu
 1 5 10 15

Tyr Ala Lys Val Leu Pro Ala Ser Leu Ala Ala Asn Ile Pro Val Lys
 20 25 30

Trp Gln Lys Leu Leu Gly Leu Asn Ser Gly Phe Ser Asn Ser Thr Ile
 35 40 45

Leu Gln Glu Thr Leu Asn Ser Lys Asn Ala Val Lys Glu Cys Arg Arg
 50 55 60
 Phe Tyr Gly Gln Val Pro Phe Leu Phe Asp Met Ser Thr Thr Ser Phe
 65 70 75 80
 Ala Ser Leu Leu Pro Arg Ser Ser Ile Leu Arg Glu Phe Leu Ser Leu
 85 90 95
 Trp Val Ile Val Thr Ile Phe Gly Leu Leu Leu Tyr Leu Phe Thr Ala
 100 105 110
 Ser Leu Ser Tyr Val Phe Val Phe Asp Lys Ser Ile Phe Asn His Pro
 115 120 125
 Arg Tyr Leu Lys Asn Gln Met Ala Met Glu Ile Lys Leu Ala Val Ser
 130 135 140
 Ala Ile Pro Trp Met Ser Met Leu Thr Val Pro Trp Phe Val Met Glu
 145 150 155 160
 Leu Asn Gly His Ser Lys Leu Tyr Met Lys Ile Asp Tyr Glu Asn His
 165 170 175
 Gly Val Arg Lys Leu Ile Glu Tyr Phe Thr Phe Ile Phe Phe Thr
 180 185 190
 Asp Cys Gly Val Tyr Leu Ala His Arg Trp Leu His Trp Pro Arg Val
 195 200 205
 Tyr Arg Ala Leu His Lys Pro His His Lys Trp Leu Val Cys Thr Pro
 210 215 220
 Phe Ala Ser His Ser Phe His Pro Val Asp Gly Phe Leu Gln Ser Ile
 225 230 235 240
 Ser Tyr His Ile Tyr Pro Leu Ile Leu Pro Leu His Lys Val Ser Tyr
 245 250 255
 Leu Ile Leu Phe Thr Phe Val Asn Phe Trp Thr Val Met Ile His Asp
 260 265 270
 Gly Gln Tyr Leu Ser Asn Asn Pro Ala Val Asn Gly Thr Ala Cys His
 275 280 285
 Thr Val His His Leu Tyr Phe Asn Tyr Asn Tyr Gly Gln Phe Thr Thr
 290 295 300
 Leu Trp Asp Arg Leu Gly Gly Ser Tyr Arg Arg Pro Asp Asp Ser Leu
 305 310 315 320
 Phe Asp Pro Lys Leu Arg Asp Ala Lys Glu Thr Trp Asp Ala Gln Val
 325 330 335
 Lys Glu Val Glu His Phe Ile Lys Glu Val Glu Gly Asp Asp Asn Asp
 340 345 350

Arg	Ile	Tyr	Glu	Asn	Asp	Pro	Asn	Thr	Lys	Lys	Asn	Asn
355							360					365

<210> 13
<211> 1557
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1557)

atg	gag	ccc	gcc	gtg	tcg	ctg	gct	tgc	ctc	ttt	ctg	ctc	48			
Met	Glu	Pro	Ala	Val	Ser	Leu	Ala	Val	Cys	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	
1								5		10			15			
tgg	gtg	cga	gtg	aag	ggg	ttg	gag	ttc	gtt	ctc	atc	cac	cag	cgc	tgg	96
Trp	Val	Arg	Val	Lys	Gly	Leu	Glu	Val	Leu	Ile	His	Gln	Arg	Trp		
								20		25			30			
gtg	ttc	gtg	tgc	ctc	ttc	ttg	ctg	ccg	ctc	tcg	atc	ttc	gat	atc	144	
Val	Phe	Val	Cys	Leu	Phe	Leu	Leu	Pro	Leu	Ser	Leu	Ile	Phe	Asp	Ile	
								35		40			45			
tac	tac	tac	gtg	cgc	gcc	tgg	gtg	ttc	aag	ctg	agc	agt	gct	ccg	192	
Tyr	Tyr	Tyr	Val	Arg	Ala	Trp	Val	Val	Phe	Lys	Leu	Ser	Ser	Ala	Pro	
								50		55			60			
cgc	ctg	cac	gag	cag	cgc	gtg	cg	gac	atc	cag	aaa	cag	gtc	cg	240	
Arg	Leu	His	Glu	Gln	Arg	Val	Arg	Asp	Ile	Gln	Lys	Gln	Val	Arg	Glu	
								65		70			75		80	
tgg	aag	gaa	cag	ggc	agt	aag	acc	ttc	atg	tgc	acg	ggg	cg	cca	ggc	288
Trp	Lys	Glu	Gln	Gly	Ser	Lys	Thr	Phe	Met	Cys	Thr	Gly	Arg	Pro	Gly	
								85		90			95			
tgg	ctc	act	gtc	tcg	ctg	cga	gtc	gga	aag	tac	aag	aag	acc	cat	aag	336
Trp	Leu	Thr	Val	Ser	Leu	Arg	Val	Gly	Lys	Tyr	Lys	Lys	Thr	His	Lys	
								100		105			110			
aac	atc	atc	atc	ctg	atg	gac	atc	ctg	gag	gtg	gac	acc	aag	aaa	384	
Asn	Ile	Met	Ile	Asn	Leu	Met	Asp	Ile	Leu	Glu	Val	Asp	Thr	Lys	Lys	
								115		120			125			
cag	att	gtt	cga	gtg	gag	ccc	ttg	gtg	tct	atg	ggt	cag	gtg	aca	gct	432
Gln	Ile	Val	Arg	Val	Glu	Pro	Leu	Val	Ser	Met	Gly	Gln	Val	Thr	Ala	
								130		135			140			
ttg	ctg	aac	tcc	att	ggc	tgg	acc	ctg	cct	gtg	ttg	cct	gag	ctt	gat	480
Leu	Leu	Asn	Ser	Ile	Gly	Trp	Thr	Leu	Pro	Val	Leu	Pro	Glu	Leu	Asp	
								145		150			155		160	
gac	ctc	aca	gtg	ggg	ggc	ctg	atc	atg	ggc	aca	ggc	atc	gag	tca	tcg	528
Asp	Leu	Thr	Val	Gly	Gly	Leu	Ile	Met	Gly	Thr	Gly	Ile	Glu	Ser	Ser	

165

170

175

tcc cac aag tat ggc ctg ttc caa cac att tgc act gcc tac gag ctg 576
 Ser His Lys Tyr Gly Leu Phe Gln His Ile Cys Thr Ala Tyr Glu Leu
 180 185 190

atc ctg gca gac ggc agc ttt gtg cgc tgc aca ccg tct gaa aac tca 624
 Ile Leu Ala Asp Gly Ser Phe Val Arg Cys Thr Pro Ser Glu Asn Ser
 195 200 205

gac ctg ttc tat gcc gtg ccc tgg tcc tgt ggg acc ctg ggc ttc ctg 672
 Asp Leu Phe Tyr Ala Val Pro Trp Ser Cys Gly Thr Leu Gly Phe Leu
 210 215 220

gtg gct gcc gag atc cgg atc atc ccg gcc aag aag tat gtc aag ctg 720
 Val Ala Ala Glu Ile Arg Ile Pro Ala Lys Lys Tyr Val Lys Leu
 225 230 235 240

cgg ttt gag cct gtt cgg ggc ctg gag gcc atc tgt gaa aaa ttc acc 768
 Arg Phe Glu Pro Val Arg Gly Leu Glu Ala Ile Cys Glu Lys Phe Thr
 245 250 255

cgc gag tcc cag cgg ctg gag aac cac ttc gtg gaa ggg ttg ctg tac 816
 Arg Glu Ser Gln Arg Leu Glu Asn His Phe Val Glu Gly Leu Leu Tyr
 260 265 270

tcc ctg gat gag gct gtg gct gtc atc atg aca ggg gtc atg acg gac 864
 Ser Leu Asp Glu Ala Val Ala Val Ile Met Thr Gly Val Met Thr Asp
 275 280 285

gac gta gag tcc agc aag ctg aat agc att ggc agt tac tac aag ccc 912
 Asp Val Glu Ser Ser Lys Leu Asn Ser Ile Gly Ser Tyr Tyr Lys Pro
 290 295 300

tgg ttc ttc aag cat gtg gag aac tac ctg aag aca aac cgg gag ggc 960
 Trp Phe Phe Lys His Val Glu Asn Tyr Leu Lys Thr Asn Arg Glu Gly
 305 310 315 320

ctc gaa tac att ccc ctg aga cac tac tac cac cga cac acg cgc acg 1008
 Leu Glu Tyr Ile Pro Leu Arg His Tyr Tyr His Arg His Thr Arg Ser
 325 330 335

atc ttc tgg gag ctc cag gac atc atc cct ttc ggc aac aac ccc atc 1056
 Ile Phe Trp Glu Leu Gln Asp Ile Ile Pro Phe Gly Asn Asn Pro Ile
 340 345 350

ttc cgc tac ctc ttc ggc tgg atg gtg cct ccc aag atc tcc ctc ctg 1104
 Phe Arg Tyr Leu Phe Gly Trp Met Val Pro Pro Lys Ile Ser Leu Leu
 355 360 365

aag ctg acc cag ggc gag acg cta cgc aag ctg tac gag cag cac cac 1152
 Lys Leu Thr Gln Gly Glu Thr Leu Arg Lys Leu Tyr Glu Gln His His
 370 375 380

gtg gtg cag gac atg ctg gtg ccc atg aag tgc atg tca cag gcc ctg 1200
 Val Val Gln Asp Met Leu Val Pro Met Lys Cys Met Ser Gln Ala Leu
 385 390 395 400

cat acc ttc caa aat gac atc cac gtc tac ccc atc tgg ctg tgc cca	1248
His Thr Phe Gln Asn Asp Ile His Val Tyr Pro Ile Trp Leu Cys Pro	
405 410 415	
ttc atc ctg ccc agc cag cca gga cta gtg cat ccc aag gga gat gaa	1296
Phe Ile Leu Pro Ser Gln Pro Gly Leu Val His Pro Lys Gly Asp Glu	
420 425 430	
gca gag ctc tac gtg gac atc ggg gca tac ggg gag cca cgt gtg aag	1344
Ala Glu Leu Tyr Val Asp Ile Gly Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Val Lys	
435 440 445	
cac ttc gag gcc agg tcc tgc atg agg cag ctg gag aag ttt gtg cgg	1392
His Phe Glu Ala Arg Ser Cys Met Arg Gln Leu Glu Lys Phe Val Arg	
450 455 460	
agt gtg cac ggg ttc caa atg tta tac gcc gat tgc tat atg aac cgc	1440
Ser Val His Gly Phe Gln Met Leu Tyr Ala Asp Cys Tyr Met Asn Arg	
465 470 475 480	
gag gaa ttc tgg gag atg ttc gat ggc tcc ttg tac cac aag ctg cgc	1488
Glu Glu Phe Trp Glu Met Phe Asp Gly Ser Leu Tyr His Lys Leu Arg	
485 490 495	
aag cag ctg ggc tgc cag gac gcc ttc cct gag gtg tac gac aag atc	1536
Lys Gln Leu Gly Cys Gln Asp Ala Phe Pro Glu Val Tyr Asp Lys Ile	
500 505 510	
tgc aag gcg gca agg cac tga	1557
Cys Lys Ala Ala Arg His	
515	

<210> 14

<211> 518

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Met Glu Pro Ala Val Ser Leu Ala Val Cys Ala Leu Leu Phe Leu Leu	
1 5 10 15	

Trp Val Arg Val Lys Gly Leu Glu Phe Val Leu Ile His Gln Arg Trp	
20 25 30	

Val Phe Val Cys Leu Phe Leu Leu Pro Leu Ser Leu Ile Phe Asp Ile	
35 40 45	

Tyr Tyr Tyr Val Arg Ala Trp Val Val Phe Lys Leu Ser Ser Ala Pro	
50 55 60	

Arg Leu His Glu Gln Arg Val Arg Asp Ile Gln Lys Gln Val Arg Glu	
65 70 75 80	

Trp Lys Glu Gln Gly Ser Lys Thr Phe Met Cys Thr Gly Arg Pro Gly	
85 90 95	

Trp Leu Thr Val Ser Leu Arg Val Gly Lys Tyr Lys Lys Thr His Lys
 100 105 110
 Asn Ile Met Ile Asn Leu Met Asp Ile Leu Glu Val Asp Thr Lys Lys
 115 120 125
 Gln Ile Val Arg Val Glu Pro Leu Val Ser Met Gly Gln Val Thr Ala
 130 135 140
 Leu Leu Asn Ser Ile Gly Trp Thr Leu Pro Val Leu Pro Glu Leu Asp
 145 150 155 160
 Asp Leu Thr Val Gly Gly Leu Ile Met Gly Thr Gly Ile Glu Ser Ser
 165 170 175
 Ser His Lys Tyr Gly Leu Phe Gln His Ile Cys Thr Ala Tyr Glu Leu
 180 185 190
 Ile Leu Ala Asp Gly Ser Phe Val Arg Cys Thr Pro Ser Glu Asn Ser
 195 200 205
 Asp Leu Phe Tyr Ala Val Pro Trp Ser Cys Gly Thr Leu Gly Phe Leu
 210 215 220
 Val Ala Ala Glu Ile Arg Ile Ile Pro Ala Lys Lys Tyr Val Lys Leu
 225 230 235 240
 Arg Phe Glu Pro Val Arg Gly Leu Glu Ala Ile Cys Glu Lys Phe Thr
 245 250 255
 Arg Glu Ser Gln Arg Leu Glu Asn His Phe Val Glu Gly Leu Leu Tyr
 260 265 270
 Ser Leu Asp Glu Ala Val Ala Val Ile Met Thr Gly Val Met Thr Asp
 275 280 285
 Asp Val Glu Ser Ser Lys Leu Asn Ser Ile Gly Ser Tyr Tyr Lys Pro
 290 295 300
 Trp Phe Phe Lys His Val Glu Asn Tyr Leu Lys Thr Asn Arg Glu Gly
 305 310 315 320
 Leu Glu Tyr Ile Pro Leu Arg His Tyr Tyr His Arg His Thr Arg Ser
 325 330 335
 Ile Phe Trp Glu Leu Gln Asp Ile Ile Pro Phe Gly Asn Asn Pro Ile
 340 345 350
 Phe Arg Tyr Leu Phe Gly Trp Met Val Pro Pro Lys Ile Ser Leu Leu
 355 360 365
 Lys Leu Thr Gln Gly Glu Thr Leu Arg Lys Leu Tyr Glu Gln His His
 370 375 380
 Val Val Gln Asp Met Leu Val Pro Met Lys Cys Met Ser Gln Ala Leu
 385 390 395 400

His Thr Phe Gln Asn Asp Ile His Val Tyr Pro Ile Trp Leu Cys Pro
 405 410 415

Phe Ile Leu Pro Ser Gln Pro Gly Leu Val His Pro Lys Gly Asp Glu
 420 425 430

Ala Glu Leu Tyr Val Asp Ile Gly Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Val Lys
 435 440 445

His Phe Glu Ala Arg Ser Cys Met Arg Gln Leu Glu Lys Phe Val Arg
 450 455 460

Ser Val His Gly Phe Gln Met Leu Tyr Ala Asp Cys Tyr Met Asn Arg
 465 470 475 480

Glu Glu Phe Trp Glu Met Phe Asp Gly Ser Leu Tyr His Lys Leu Arg
 485 490 495

Lys Gln Leu Gly Cys Gln Asp Ala Phe Pro Glu Val Tyr Asp Lys Ile
 500 505 510

Cys Lys Ala Ala Arg His
 515

<210> 15

<211> 1551

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1551)

<400> 15

atg gag ccc gcc gtg tcg ctg gcc gtg tgc gcg ctg ctc ttc ctg ctg 48
 Met Glu Pro Ala Val Ser Leu Ala Val Cys Ala Leu Leu Phe Leu Leu
 1 5 10 15

tgg gtg cgc ctg aag ggg ctg gag ttc gtg ctc atc cac cag cgc tgg 96
 Trp Val Arg Leu Lys Gly Leu Glu Phe Val Leu Ile His Gln Arg Trp
 20 25 30

gtg ttc gtg tgc ctc ttc ctc ctg ccg ctc tcg ctt atc ttc gat atc 144
 Val Phe Val Cys Leu Phe Leu Leu Pro Leu Ser Leu Ile Phe Asp Ile
 35 40 45

tac tac tac gtg cgc gcc tgg gtg ttc aag ctc agc agc gct ccg 192
 Tyr Tyr Tyr Val Arg Ala Trp Val Val Phe Lys Leu Ser Ser Ala Pro
 50 55 60

cgc ctg cac gag cag cgc gtg cgg gac atc cag aag cag gtg cgg gaa 240
 Arg Leu His Glu Gln Arg Val Arg Asp Ile Gln Lys Gln Val Arg Glu
 65 70 75 80

tgg aag gag cag ggt agc aag acc ttc atg tgc acg ggg cgc cct ggc 288

Trp Lys Glu Gln Gly Ser Lys Thr Phe Met Cys Thr Gly Arg Pro Gly			
85	90	95	
tgg ctc act gtc tca cta cgt gtc ggg aag tac aag aag aca cac aaa			336
Trp Leu Thr Val Ser Leu Arg Val Gly Lys Tyr Lys Lys Thr His Lys			
100	105	110	
aac atc atg atc aac ctg atg gac att ctg gaa gtg gac acc aag aaa			384
Asn Ile Met Ile Asn Leu Met Asp Ile Leu Glu Val Asp Thr Lys Lys			
115	120	125	
cag att gtc cgt gtg gag ccc ttg gtg acc atg ggc cag gtg act gcc			432
Gln Ile Val Arg Val Glu Pro Leu Val Thr Met Gly Gln Val Thr Ala			
130	135	140	
ctg ctg acc tcc att ggc tgg act ctc ccc gtg ttg cct gag ctt gat			480
Leu Leu Thr Ser Ile Gly Trp Thr Leu Pro Val Leu Pro Glu Leu Asp			
145	150	155	160
gac ctc aca gtg ggg ggc ttg atc atg ggc aca ggc atc gag tca tca			528
Asp Leu Thr Val Gly Gly Leu Ile Met Gly Thr Gly Ile Glu Ser Ser			
165	170	175	
tcc cac aag tac ggc ctg ttc caa cac atc tgc act gct tac gag ctg			576
Ser His Lys Tyr Gly Leu Phe Gln His Ile Cys Thr Ala Tyr Glu Leu			
180	185	190	
gtc ctg gct gat ggc agc ttt gtg cga tgc act ccg tcc gaa aac tca			624
Val Leu Ala Asp Gly Ser Phe Val Arg Cys Thr Pro Ser Glu Asn Ser			
195	200	205	
gac ctg ttc tat gcc gta ccc tgg tcc tgt ggg acg ctg ggt ttc ctg			672
Asp Leu Phe Tyr Ala Val Pro Trp Ser Cys Gly Thr Leu Gly Phe Leu			
210	215	220	
gtg gcc gct gag atc cgc atc atc cct gcc aag aag tac gtc aag ctg			720
Val Ala Ala Glu Ile Arg Ile Pro Ala Lys Lys Tyr Val Lys Leu			
225	230	235	240
cgt ttc gag cca gtg cggt ggc ctg gag gct atc tgt gcc aag ttc acc			768
Arg Phe Glu Pro Val Arg Gly Leu Glu Ala Ile Cys Ala Lys Phe Thr			
245	250	255	
cac gag tcc cag cgg cag gag aac cac ttc gtg gaa ggg ctg ctc tac			816
His Glu Ser Gln Arg Gln Glu Asn His Phe Val Glu Gly Leu Leu Tyr			
260	265	270	
tcc ctg gat gag gct gtc att atg aca ggg gtc atg aca gat gag gca			864
Ser Leu Asp Glu Ala Val Ile Met Thr Gly Val Met Thr Asp Glu Ala			
275	280	285	
gag ccc agc aag ctg aat agc att ggc aat tac tac aag ccg tgg ttc			912
Glu Pro Ser Lys Leu Asn Ser Ile Gly Asn Tyr Tyr Lys Pro Trp Phe			
290	295	300	
ttt aag cat gtg gag aac tat ctg aag aca aac cga gag ggc ctg gag			960
Phe Lys His Val Glu Asn Tyr Leu Lys Thr Asn Arg Glu Gly Leu Glu			

22

305	310	315	320	
tac att ccc ttg aga cac tac tac cac cgc cac acg cgc acg atc ttc Tyr Ile Pro Leu Arg His Tyr Tyr His Arg His Thr Arg Ser Ile Phe 325 330 335				1008
tgg gag ctc cag gac atc atc ccc ttt ggc aac aac ccc atc ttc cgc Trp Glu Leu Gln Asp Ile Ile Pro Phe Gly Asn Asn Pro Ile Phe Arg 340 345 350				1056
tac ctc ttt ggc tgg atg gtg cct ccc aag atc tcc ctc ctg aag ctg Tyr Leu Phe Gly Trp Met Val Pro Pro Lys Ile Ser Leu Leu Lys Leu 355 360 365				1104
acc cag ggt gag acc ctg cgc aag ctg tac gag cag cac cac gtg gtg Thr Gln Gly Glu Thr Leu Arg Lys Leu Tyr Glu Gln His His Val Val 370 375 380				1152
cag gac atg ctg gtg ccc atg aag tgc ctg cag cag gcc ctg cac acc Gln Asp Met Leu Val Pro Met Lys Cys Leu Gln Gln Ala Leu His Thr 385 390 395 400				1200
ttc caa aac gac atc cac gtc tac ccc atc tgg ctg tgt ccg ttc atc Phe Gln Asn Asp Ile His Val Tyr Pro Ile Trp Leu Cys Pro Phe Ile 405 410 415				1248
ctg ccc agc cag cca ggc cta gtg cac ccc aaa gga aat gag gca gag Leu Pro Ser Gln Pro Gly Leu Val His Pro Lys Gly Asn Glu Ala Glu 420 425 430				1296
ctc tac atc gac att gga gca tat ggg gag ccg cgt gtg aaa cac ttt Leu Tyr Ile Asp Ile Gly Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Val Lys His Phe 435 440 445				1344
gaa gcc agg tcc tgc atg agg cag ctg gag aag ttt gtc cgc agc gtg Glu Ala Arg Ser Cys Met Arg Gln Leu Glu Lys Phe Val Arg Ser Val 450 455 460				1392
cat ggc ttc cag atg ctg tat gcc gac tgc tac atg aac cgg gag gag His Gly Phe Gln Met Leu Tyr Ala Asp Cys Tyr Met Asn Arg Glu Glu 465 470 475 480				1440
ttc tgg gag atg ttt gat ggc tcc ttg tac cac aag ctg cga gag aag Phe Trp Glu Met Phe Asp Gly Ser Leu Tyr His Lys Leu Arg Glu Lys 485 490 495				1488
ctg ggt tgc cag gac gcc ttc ccc gag gtg tac gac aag atc tgc aag Leu Gly Cys Gln Asp Ala Phe Pro Glu Val Tyr Asp Lys Ile Cys Lys 500 505 510				1536
gcc gcc agg cac tga Ala Ala Arg His 515				1551

<210> 16
<211> 516

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Glu Pro Ala Val Ser Leu Ala Val Cys Ala Leu Leu Phe Leu Leu
1 5 10 15

Trp Val Arg Leu Lys Gly Leu Glu Phe Val Leu Ile His Gln Arg Trp
20 25 30

Val Phe Val Cys Leu Phe Leu Leu Pro Leu Ser Leu Ile Phe Asp Ile
35 40 45

Tyr Tyr Tyr Val Arg Ala Trp Val Val Phe Lys Leu Ser Ser Ala Pro
50 55 60

Arg Leu His Glu Gln Arg Val Arg Asp Ile Gln Lys Gln Val Arg Glu
65 70 75 80

Trp Lys Glu Gln Gly Ser Lys Thr Phe Met Cys Thr Gly Arg Pro Gly
85 90 95

Trp Leu Thr Val Ser Leu Arg Val Gly Lys Tyr Lys Lys Thr His Lys
100 105 110

Asn Ile Met Ile Asn Leu Met Asp Ile Leu Glu Val Asp Thr Lys Lys
115 120 125

Gln Ile Val Arg Val Glu Pro Leu Val Thr Met Gly Gln Val Thr Ala
130 135 140

Leu Leu Thr Ser Ile Gly Trp Thr Leu Pro Val Leu Pro Glu Leu Asp
145 150 155 160

Asp Leu Thr Val Gly Gly Leu Ile Met Gly Thr Gly Ile Glu Ser Ser
165 170 175

Ser His Lys Tyr Gly Leu Phe Gln His Ile Cys Thr Ala Tyr Glu Leu
180 185 190

Val Leu Ala Asp Gly Ser Phe Val Arg Cys Thr Pro Ser Glu Asn Ser
195 200 205

Asp Leu Phe Tyr Ala Val Pro Trp Ser Cys Gly Thr Leu Gly Phe Leu
210 215 220

Val Ala Ala Glu Ile Arg Ile Ile Pro Ala Lys Lys Tyr Val Lys Leu
225 230 235 240

Arg Phe Glu Pro Val Arg Gly Leu Glu Ala Ile Cys Ala Lys Phe Thr
245 250 255

His Glu Ser Gln Arg Gln Glu Asn His Phe Val Glu Gly Leu Leu Tyr
260 265 270

Ser Leu Asp Glu Ala Val Ile Met Thr Gly Val Met Thr Asp Glu Ala
275 280 285

Glu Pro Ser Lys Leu Asn Ser Ile Gly Asn Tyr Tyr Lys Pro Trp Phe
 290 295 300

Phe Lys His Val Glu Asn Tyr Leu Lys Thr Asn Arg Glu Gly Leu Glu
 305 310 315 320

Tyr Ile Pro Leu Arg His Tyr Tyr His Arg His Thr Arg Ser Ile Phe
 325 330 335

Trp Glu Leu Gln Asp Ile Ile Pro Phe Gly Asn Asn Pro Ile Phe Arg
 340 345 350

Tyr Leu Phe Gly Trp Met Val Pro Pro Lys Ile Ser Leu Leu Lys Leu
 355 360 365

Thr Gln Gly Glu Thr Leu Arg Lys Leu Tyr Glu Gln His His Val Val
 370 375 380

Gln Asp Met Leu Val Pro Met Lys Cys Leu Gln Gln Ala Leu His Thr
 385 390 395 400

Phe Gln Asn Asp Ile His Val Tyr Pro Ile Trp Leu Cys Pro Phe Ile
 405 410 415

Leu Pro Ser Gln Pro Gly Leu Val His Pro Lys Gly Asn Glu Ala Glu
 420 425 430

Leu Tyr Ile Asp Ile Gly Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Val Lys His Phe
 435 440 445

Glu Ala Arg Ser Cys Met Arg Gln Leu Glu Lys Phe Val Arg Ser Val
 450 455 460

His Gly Phe Gln Met Leu Tyr Ala Asp Cys Tyr Met Asn Arg Glu Glu
 465 470 475 480

Phe Trp Glu Met Phe Asp Gly Ser Leu Tyr His Lys Leu Arg Glu Lys
 485 490 495

Leu Gly Cys Gln Asp Ala Phe Pro Glu Val Tyr Asp Lys Ile Cys Lys
 500 505 510

Ala Ala Arg His
 515

<210> 17
 <211> 1422
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1422)

<400> 17

atg gca aag gat aat agt gag aag ctg cag gtg cag gga gag gag aaa Met Ala Lys Asp Asn Ser Glu Lys Leu Gln Val Gln Gly Glu Glu Lys	15	48
1 5 10		
aag tcc aag caa ccg gtt aat ttc ctg cct cag ggt aaa tgg ctg aag Lys Ser Lys Gln Pro Val Asn Phe Leu Pro Gln Gly Lys Trp Leu Lys	20 25 30	96
Pro Asn Glu Ile Glu Tyr Phe Gly Thr Thr Gly Val Ile Gly		
35 40 45		
cca aat gaa atc gaa tat gag ttt ggt ggg act act ggt gtt att ggt Pro Asn Glu Ile Glu Tyr Phe Gly Thr Thr Gly Val Ile Gly	144	
Met Leu Ile Gly Phe Pro Leu Leu Met Tyr Tyr Met Trp Ile Cys Ala		
50 55 60		
atg ctg atc ggg ttt cca ctg cta atg tac tat atg tgg att tgt gcg Met Leu Ile Gly Phe Pro Leu Leu Met Tyr Tyr Met Trp Ile Cys Ala	192	
Glu Phe Tyr His Gly Lys Val Ala Leu Pro Lys Ala Gly Glu Ser Trp		
65 70 75 80		
gaa ttt tat cac ggt aag gtt gcc cta ccc aag gct ggt gaa tcg tgg Glu Phe Tyr His Gly Lys Val Ala Leu Pro Lys Ala Gly Glu Ser Trp	240	
atg cac ttt atc aag cac cta tac cag tta gtc ttg gag aac ggt atc Met His Phe Ile Lys His Leu Tyr Gln Leu Val Leu Glu Asn Gly Ile	288	
85 90 95		
cca gaa aag tat gac tgg act att ttc tta aca ttt tgg gtc ttt cag Pro Glu Lys Tyr Asp Trp Thr Ile Phe Leu Thr Phe Trp Val Phe Gln	336	
100 105 110		
atc att ttc tac tat acg ttg ccc ggg att tgg aca aaa ggt caa cca Ile Ile Phe Tyr Tyr Leu Pro Gly Ile Trp Thr Lys Gly Gln Pro	384	
115 120 125		
ttg tct cat ttg aag gga aaa caa ttg cct tac ttt tgt aat gcc atg Leu Ser His Leu Lys Gly Lys Gln Leu Pro Tyr Phe Cys Asn Ala Met	432	
130 135 140		
tgg acc ttg tat gta act acc act ttg gtc ttg gtt ttg cac ttt acc Trp Thr Leu Tyr Val Thr Thr Leu Val Leu Val Leu His Phe Thr	480	
145 150 155 160		
aat ctt ttt aga ttg tat gtc att att gac cgt ttt ggg agg atc atg Asn Leu Phe Arg Leu Tyr Val Ile Ile Asp Arg Phe Gly Arg Ile Met	528	
165 170 175		
aca tgt gcc att att tca ggg ttt gcc ttc tcc atc ata ttg tac tta Thr Cys Ala Ile Ile Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Ile Leu Tyr Leu	576	
180 185 190		
tgg act tta ttt atc tca cat gac tat cat aga atg aca gga aac cat Trp Thr Leu Phe Ile Ser His Asp Tyr His Arg Met Thr Gly Asn His	624	
195 200 205		
cta tat gat ttc ttc atg gga gct cca cta aac cct agg tgg ggg att Leu Tyr Asp Phe Phe Met Gly Ala Pro Leu Asn Pro Arg Trp Gly Ile	672	
210 215 220		
ttg gac ttg aag atg ttt ttc gag gtt aga tta cct tgg ttc acc ctt	720	

Leu Asp Leu Lys Met Phe Phe Glu Val Arg Leu Pro Trp Phe Thr Leu			
225	230	235	240
tac ttt atc act ttg ggt gcc tgt ttg aag cag tgg gag act tac ggc			768
Tyr Phe Ile Thr Leu Gly Ala Cys Leu Lys Gln Trp Glu Thr Tyr Gly			
245	250	255	
tat gtg aca cca caa ttg ggg gtt gtc atg tta gct cat tgg ttg tac			816
Tyr Val Thr Pro Gln Leu Gly Val Val Met Leu Ala His Trp Leu Tyr			
260	265	270	
gct aac gca tgg gct aaa ggt gaa gaa ttg att gtt cca acc tgg gac			864
Ala Asn Ala Cys Ala Lys Gly Glu Glu Leu Ile Val Pro Thr Trp Asp			
275	280	285	
atg gct tac gaa aag ttt gga ttt atg ctg atc ttc tgg aat att gcc			912
Met Ala Tyr Glu Lys Phe Gly Phe Met Leu Ile Phe Trp Asn Ile Ala			
290	295	300	
ggc gtc cca tac act tac tgt cat tgt acg ttg tat ttg tac tac cat			960
Gly Val Pro Tyr Thr Tyr Cys His Cys Thr Leu Tyr Leu Tyr Tyr His			
305	310	315	320
gac cca tct gaa tat cac tgg tct aca ctg tac aat gtt tcg ctg tac			1008
Asp Pro Ser Glu Tyr His Trp Ser Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Tyr			
325	330	335	
gtt gtt cta tta tgc gcc tac tac ttc ttt gac acg gca aat gct cag			1056
Val Val Leu Leu Cys Ala Tyr Tyr Phe Phe Asp Thr Ala Asn Ala Gln			
340	345	350	
aaa aat gcc ttc aga aag caa atg tct ggt gac aag aca ggt agg aag			1104
Lys Asn Ala Phe Arg Lys Gln Met Ser Gly Asp Lys Thr Gly Arg Lys			
355	360	365	
act ttc cca ttt ttg cca tac caa att ttg aag aat cca aag tat atg			1152
Thr Phe Pro Phe Leu Pro Tyr Gln Ile Leu Lys Asn Pro Lys Tyr Met			
370	375	380	
gtt acc tcc aat gga tcg tac cta ttg att gat ggt tgg tac act ttg			1200
Val Thr Ser Asn Gly Ser Tyr Leu Leu Ile Asp Gly Trp Tyr Thr Leu			
385	390	395	400
gct aga aaa att cac tac act gcc gat tgg act caa tct ctc gtt tgg			1248
Ala Arg Lys Ile His Tyr Thr Ala Asp Trp Thr Gln Ser Leu Val Trp			
405	410	415	
gcc ttg tct tgc ggg ttc aac tcg gtg ttc cca tgg ttt ttc cca gta			1296
Ala Leu Ser Cys Gly Phe Asn Ser Val Phe Pro Trp Phe Phe Pro Val			
420	425	430	
ttc ttc ctt gtt gtc ctg att cac aga gcc ttc aga gac caa gca aaa			1344
Phe Phe Leu Val Val Leu Ile His Arg Ala Phe Arg Asp Gln Ala Lys			
435	440	445	
tgt aag aga aag tac gga aaa gat tgg gat gag tat tgt aaa cat tgc			1392
Cys Lys Arg Lys Tyr Gly Lys Asp Trp Asp Glu Tyr Cys Lys His Cys			

450	455	460	
cct tac gtc ttt att cct tat gtt ttc tag			1422
Pro Tyr Val Phe Ile Pro Tyr Val Phe			
465	470		
<210> 18			
<211> 473			
<212> PRT			
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
<400> 18			
Met Ala Lys Asp Asn Ser Glu Lys Leu Gln Val Gln Gly Glu Glu Lys			
1	5	10	15
Lys Ser Lys Gln Pro Val Asn Phe Leu Pro Gln Gly Lys Trp Leu Lys			
20	25	30	
Pro Asn Glu Ile Glu Tyr Glu Phe Gly Gly Thr Thr Gly Val Ile Gly			
35	40	45	
Met Leu Ile Gly Phe Pro Leu Leu Met Tyr Tyr Met Trp Ile Cys Ala			
50	55	60	
Glu Phe Tyr His Gly Lys Val Ala Leu Pro Lys Ala Gly Glu Ser Trp			
65	70	75	80
Met His Phe Ile Lys His Leu Tyr Gln Leu Val Leu Glu Asn Gly Ile			
85	90	95	
Pro Glu Lys Tyr Asp Trp Thr Ile Phe Leu Thr Phe Trp Val Phe Gln			
100	105	110	
Ile Ile Phe Tyr Tyr Thr Leu Pro Gly Ile Trp Thr Lys Gly Gln Pro			
115	120	125	
Leu Ser His Leu Lys Gly Lys Gln Leu Pro Tyr Phe Cys Asn Ala Met			
130	135	140	
Trp Thr Leu Tyr Val Thr Thr Leu Val Leu Val Leu His Phe Thr			
145	150	155	160
Asn Leu Phe Arg Leu Tyr Val Ile Ile Asp Arg Phe Gly Arg Ile Met			
165	170	175	
Thr Cys Ala Ile Ile Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Ile Leu Tyr Leu			
180	185	190	
Trp Thr Leu Phe Ile Ser His Asp Tyr His Arg Met Thr Gly Asn His			
195	200	205	
Leu Tyr Asp Phe Phe Met Gly Ala Pro Leu Asn Pro Arg Trp Gly Ile			
210	215	220	
Leu Asp Leu Lys Met Phe Phe Glu Val Arg Leu Pro Trp Phe Thr Leu			
225	230	235	240

Tyr Phe Ile Thr Leu Gly Ala Cys Leu Lys Gln Trp Glu Thr Tyr Gly
 245 250 255
 Tyr Val Thr Pro Gln Leu Gly Val Val Met Leu Ala His Trp Leu Tyr
 260 265 270
 Ala Asn Ala Cys Ala Lys Gly Glu Glu Leu Ile Val Pro Thr Trp Asp
 275 280 285
 Met Ala Tyr Glu Lys Phe Gly Phe Met Leu Ile Phe Trp Asn Ile Ala
 290 295 300
 Gly Val Pro Tyr Thr Tyr Cys His Cys Thr Leu Tyr Leu Tyr Tyr His
 305 310 315 320
 Asp Pro Ser Glu Tyr His Trp Ser Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Tyr
 325 330 335
 Val Val Leu Leu Cys Ala Tyr Tyr Phe Phe Asp Thr Ala Asn Ala Gln
 340 345 350
 Lys Asn Ala Phe Arg Lys Gln Met Ser Gly Asp Lys Thr Gly Arg Lys
 355 360 365
 Thr Phe Pro Phe Leu Pro Tyr Gln Ile Leu Lys Asn Pro Lys Tyr Met
 370 375 380
 Val Thr Ser Asn Gly Ser Tyr Leu Leu Ile Asp Gly Trp Tyr Thr Leu
 385 390 395 400
 Ala Arg Lys Ile His Tyr Thr Ala Asp Trp Thr Gln Ser Leu Val Trp
 405 410 415
 Ala Leu Ser Cys Gly Phe Asn Ser Val Phe Pro Trp Phe Phe Pro Val
 420 425 430
 Phe Phe Leu Val Val Leu Ile His Arg Ala Phe Arg Asp Gln Ala Lys
 435 440 445
 Cys Lys Arg Lys Tyr Gly Lys Asp Trp Asp Glu Tyr Cys Lys His Cys
 450 455 460
 Pro Tyr Val Phe Ile Pro Tyr Val Phe
 465 470

<210> 19
 <211> 1152
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1152)

<400> 19

atg agt gaa aca gaa ttg aga aaa aga cag gcc caa ttc act agg gag Met Ser Glu Thr Glu Leu Arg Lys Arg Gln Ala Gln Phe Thr Arg Glu 1 5 10 15	48
tta cat ggt gat gat att ggt aaa aag aca ggt ttg agt gca ttg atg Leu His Gly Asp Asp Ile Gly Lys Lys Thr Gly Leu Ser Ala Leu Met 20 25 30	96
tcg aag aac aac tct gcc caa aag gaa gcc gtt cag aag tac ttg aga Ser Lys Asn Asn Ser Ala Gln Lys Glu Ala Val Gln Lys Tyr Leu Arg 35 40 45	144
aat tgg gat ggt aga acc gat aaa gat gcc gaa gaa cgt cgt ctt gag Asn Trp Asp Gly Arg Thr Asp Lys Asp Ala Glu Glu Arg Arg Leu Glu 50 55 60	192
gat tat aat gaa gcc aca cat tcc tac tat aac gtc gtt aca gat ttc Asp Tyr Asn Glu Ala Thr His Ser Tyr Tyr Asn Val Val Thr Asp Phe 65 70 75 80	240
tat gaa tat ggt tgg ggt tcc tct ttc cat ttc agc aga ttt tat aaa Tyr Glu Tyr Gly Trp Gly Ser Ser Phe His Phe Ser Arg Phe Tyr Lys 85 90 95	288
ggt gag agt ttc gct gcc tcg ata gca aga cat gaa cat tat tta gct Gly Glu Ser Phe Ala Ala Ser Ile Ala Arg His Glu His Tyr Leu Ala 100 105 110	336
tac aag gct ggt att caa aga ggc gat tta gtt ctc gac gtt ggt tgt Tyr Lys Ala Gly Ile Gln Arg Gly Asp Leu Val Leu Asp Val Gly Cys 115 120 125	384
ggt gtt ggg ggc cca gca aga gag att gca aga ttt acc ggt tgt aac Gly Val Gly Pro Ala Arg Glu Ile Ala Arg Phe Thr Gly Cys Asn 130 135 140	432
gtc atc ggt cta aac aat aac gat tac caa att gcc aag gca aaa tat Val Ile Gly Leu Asn Asn Asn Asp Tyr Gln Ile Ala Lys Ala Lys Tyr 145 150 155 160	480
tac gct aaa aaa tac aat ttg agt gac caa atg gac ttt gta aag ggt Tyr Ala Lys Lys Tyr Asn Leu Ser Asp Gln Met Asp Phe Val Lys Gly 165 170 175	528
gat ttc atg aaa atg gat ttc gaa gaa aac act ttc gac aaa gtt tat Asp Phe Met Lys Met Asp Phe Glu Glu Asn Thr Phe Asp Lys Val Tyr 180 185 190	576
gca att gag gcc aca tgt cac gct cca aaa tta gaa ggt gta tac agc Ala Ile Glu Ala Thr Cys His Ala Pro Lys Leu Glu Gly Val Tyr Ser 195 200 205	624
gaa atc tac aag gtt ttg aaa ccg ggt ggt acc ttt gct gtt tac gaa Glu Ile Tyr Lys Val Leu Lys Pro Gly Gly Thr Phe Ala Val Tyr Glu 210 215 220	672
tgg gta atg act gat aaa tat gac gaa aac aat cct gaa cat aga aag	720

Trp Val Met Thr Asp Lys Tyr Asp Glu Asn Asn Pro Glu His Arg Lys			
225	230	235	240
atc gct tat gaa att gaa cta ggt gat ggt atc cca aag atg ttc cat			768
Ile Ala Tyr Glu Ile Glu Leu Gly Asp Gly Ile Pro Lys Met Phe His			
245	250	255	
gtc gac gtg gct agg aaa gca ttg aag aac tgt ggt ttc gaa gtc ctc			816
Val Asp Val Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asn Cys Gly Phe Glu Val Leu			
260	265	270	
gtt agc gaa gac ctg gcg gac aat gat gat gaa atc cct tgg tat tac			864
Val Ser Glu Asp Leu Ala Asp Asn Asp Glu Ile Pro Trp Tyr Tyr			
275	280	285	
cca tta act ggt gag tgg aag tac gtt caa aac tta gct aat ttg gcc			912
Pro Leu Thr Gly Glu Trp Lys Tyr Val Gln Asn Leu Ala Asn Leu Ala			
290	295	300	
aca ttt ttc aga act tct tac ttg ggt aga caa ttt act aca gca atg			960
Thr Phe Phe Arg Thr Ser Tyr Leu Gly Arg Gln Phe Thr Thr Ala Met			
305	310	315	320
gtt act gta atg gaa aaa tta ggt cta gcc cca gaa ggt tcc aag gaa			1008
Val Thr Val Met Glu Lys Leu Gly Leu Ala Pro Glu Gly Ser Lys Glu			
325	330	335	
gtt act gct gct cta gaa aat gct gcg gtt ggt tta gtt gcc ggt ggt			1056
Val Thr Ala Ala Leu Glu Asn Ala Ala Val Gly Leu Val Ala Gly Gly			
340	345	350	
aag tcc aag tta ttc act cca atg atg ctt ttc gtc gct agg aag cca			1104
Lys Ser Lys Leu Phe Thr Pro Met Met Leu Phe Val Ala Arg Lys Pro			
355	360	365	
gaa aac gcc gaa acc ccc tcc caa act tcc caa gaa gca act caa taa			1152
Glu Asn Ala Glu Thr Pro Ser Gln Thr Ser Gln Glu Ala Thr Gln			
370	375	380	

<210> 20

<211> 383

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 20

Met Ser Glu Thr Glu Leu Arg Lys Arg Gln Ala Gln Phe Thr Arg Glu			
1	5	10	15

Leu His Gly Asp Asp Ile Gly Lys Lys Thr Gly Leu Ser Ala Leu Met			
20	25	30	

Ser Lys Asn Asn Ser Ala Gln Lys Glu Ala Val Gln Lys Tyr Leu Arg			
35	40	45	

Asn Trp Asp Gly Arg Thr Asp Lys Asp Ala Glu Glu Arg Arg Leu Glu			
50	55	60	

Asp Tyr Asn Glu Ala Thr His Ser Tyr Tyr Asn Val Val Thr Asp Phe
 65 70 75 80
 Tyr Glu Tyr Gly Trp Gly Ser Ser Phe His Phe Ser Arg Phe Tyr Lys
 85 90 95
 Gly Glu Ser Phe Ala Ala Ser Ile Ala Arg His Glu His Tyr Leu Ala
 100 105 110
 Tyr Lys Ala Gly Ile Gln Arg Gly Asp Leu Val Leu Asp Val Gly Cys
 115 120 125
 Gly Val Gly Gly Pro Ala Arg Glu Ile Ala Arg Phe Thr Gly Cys Asn
 130 135 140
 Val Ile Gly Leu Asn Asn Asn Asp Tyr Gln Ile Ala Lys Ala Lys Tyr
 145 150 155 160
 Tyr Ala Lys Lys Tyr Asn Leu Ser Asp Gln Met Asp Phe Val Lys Gly
 165 170 175
 Asp Phe Met Lys Met Asp Phe Glu Glu Asn Thr Phe Asp Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Ile Glu Ala Thr Cys His Ala Pro Lys Leu Glu Gly Val Tyr Ser
 195 200 205
 Glu Ile Tyr Lys Val Leu Lys Pro Gly Gly Thr Phe Ala Val Tyr Glu
 210 215 220
 Trp Val Met Thr Asp Lys Tyr Asp Glu Asn Asn Pro Glu His Arg Lys
 225 230 235 240
 Ile Ala Tyr Glu Ile Glu Leu Gly Asp Gly Ile Pro Lys Met Phe His
 245 250 255
 Val Asp Val Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asn Cys Gly Phe Glu Val Leu
 260 265 270
 Val Ser Glu Asp Leu Ala Asp Asn Asp Asp Glu Ile Pro Trp Tyr Tyr
 275 280 285
 Pro Leu Thr Gly Glu Trp Lys Tyr Val Gln Asn Leu Ala Asn Leu Ala
 290 295 300
 Thr Phe Phe Arg Thr Ser Tyr Leu Gly Arg Gln Phe Thr Thr Ala Met
 305 310 315 320
 Val Thr Val Met Glu Lys Leu Gly Leu Ala Pro Glu Gly Ser Lys Glu
 325 330 335
 Val Thr Ala Ala Leu Glu Asn Ala Ala Val Gly Leu Val Ala Gly Gly
 340 345 350
 Lys Ser Lys Leu Phe Thr Pro Met Met Leu Phe Val Ala Arg Lys Pro
 355 360 365

Glu Asn Ala Glu Thr Pro Ser Gln Thr Ser Gln Glu Ala Thr Gln
 370 375 380

<210> 21

<211> 1617

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1617)

<400> 21

atg	agt	tct	gtc	gca	gaa	aat	ata	ata	caa	cat	gcc	act	cat	aat	tct	48
Met	Ser	Ser	Val	Ala	Glu	Asn	Ile	Ile	Gln	His	Ala	Thr	His	Asn	Ser	
1															15	

acg	cta	cac	caa	ttg	gct	aaa	gac	cag	ccc	tct	gta	ggc	gtc	act	act	96
Thr	Leu	His	Gln	Leu	Ala	Lys	Asp	Gln	Pro	Ser	Val	Gly	Val	Thr	Thr	
20															30	

gcc	ttc	agt	atc	ctg	gat	aca	ctt	aag	tct	atg	tca	tat	ttg	aaa	ata	144
Ala	Phe	Ser	Ile	Leu	Asp	Thr	Leu	Lys	Ser	Met	Ser	Tyr	Leu	Lys	Ile	
35															45	

ttt	gct	act	tta	atc	tgt	att	ctt	ttg	gtt	tgg	gac	caa	gtt	gca	tat	192
Phe	Ala	Thr	Leu	Ile	Cys	Ile	Leu	Leu	Val	Trp	Asp	Gln	Val	Ala	Tyr	
50															60	

caa	atc	aag	aaa	ggt	tcc	atc	gca	ggt	cca	aag	ttt	aag	ttc	tgg	ccc	240
Gln	Ile	Lys	Lys	Gly	Ser	Ile	Ala	Gly	Pro	Lys	Phe	Lys	Phe	Trp	Pro	
65															80	

atc	atc	ggt	cca	ttt	ttg	gaa	tcc	tta	gat	cca	aag	ttt	gaa	gaa	tat	288
Ile	Ile	Gly	Pro	Phe	Leu	Glu	Ser	Leu	Asp	Pro	Lys	Phe	Glu	Tyr		
85															95	

aag	gct	aag	tgg	gca	tcc	ggt	cca	ctt	tca	tgt	gtt	tct	att	ttc	cat	336
Lys	Ala	Lys	Trp	Ala	Ser	Gly	Pro	Leu	Ser	Cys	Val	Ser	Ile	Phe	His	
100															110	

aaa	ttt	gtt	atc	gca	tct	act	aga	gac	ttg	gca	aga	aag	atc	ttg	384
Lys	Phe	Val	Val	Ile	Ala	Ser	Thr	Arg	Asp	Leu	Ala	Arg	Lys	Ile	Leu
115															125

caa	tct	tcc	aaa	ttc	gtc	aaa	cct	tgc	gtt	gtc	gat	gtt	gct	gtg	aag	432
Gln	Ser	Ser	Lys	Phe	Val	Lys	Pro	Cys	Val	Val	Asp	Val	Ala	Val	Lys	
130															140	

atc	tta	aga	cct	tgc	aat	tgg	gtt	ttt	ttg	gac	ggt	aaa	gct	cat	act	480
Ile	Leu	Arg	Pro	Cys	Asn	Trp	Val	Phe	Leu	Asp	Gly	Lys	Ala	His	Thr	
145															160	

gat	tac	aga	aaa	tca	tta	aac	ggt	ctt	ttc	act	aaa	caa	gct	ttg	gct	528
Asp	Tyr	Arg	Lys	Ser	Leu	Asn	Gly	Leu	Phe	Thr	Lys	Gln	Ala	Leu	Ala	

165

170

175

caa tac tta cct tca ttg gaa caa atc atg gat aag tac atg gat aag 576
 Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Glu Gln Ile Met Asp Lys Tyr Met Asp Lys
 180 185 190

ttt gtt cgt tta tct aag gag aat aac tac gag ccc cag gtc ttt ttc 624
 Phe Val Arg Leu Ser Lys Glu Asn Asn Tyr Glu Pro Gln Val Phe Phe
 195 200 205

cat gaa atg aga gaa att ctt tgc gcc tta tca ttg aac tct ttc tgt 672
 His Glu Met Arg Glu Ile Leu Cys Ala Leu Ser Leu Asn Ser Phe Cys
 210 215 220

ggt aac tat att acc gaa gat caa gtc aga aag att gct gat gat tac 720
 Gly Asn Tyr Ile Thr Glu Asp Gln Val Arg Lys Ile Ala Asp Asp Tyr
 225 230 235 240

tat ttg gtt aca gca gca ttg gaa tta gtc aac ttc cca att att atc 768
 Tyr Leu Val Thr Ala Ala Leu Glu Leu Val Asn Phe Pro Ile Ile Ile
 245 250 255

cct tac act aaa aca tgg tat ggt aag aaa act gca gac atg gcc atg 816
 Pro Tyr Thr Lys Thr Trp Tyr Gly Lys Lys Thr Ala Asp Met Ala Met
 260 265 270

aag att ttc gaa aac tgt gct caa atg gct aag gat cat att gct gca 864
 Lys Ile Phe Glu Asn Cys Ala Gln Met Ala Lys Asp His Ile Ala Ala
 275 280 285

ggg ggt aag cca gtt tgt gtt atg gat gct tgg tgt aag ttg atg cac 912
 Gly Gly Lys Pro Val Cys Val Met Asp Ala Trp Cys Lys Leu Met His
 290 295 300

gat gca aag aat agt aac gat gat gat tct aga atc tac cac aga gag 960
 Asp Ala Lys Asn Ser Asn Asp Asp Asp Ser Arg Ile Tyr His Arg Glu
 305 310 315 320

ttt act aac aag gaa atc tcc gaa gct gtt ttc act ttc tta ttt gct 1008
 Phe Thr Asn Lys Glu Ile Ser Glu Ala Val Phe Thr Phe Leu Phe Ala
 325 330 335

tct caa gat gcc tct tct tta gct tgt tgg ttg ttc caa att gtt 1056
 Ser Gln Asp Ala Ser Ser Ser Leu Ala Cys Trp Leu Phe Gln Ile Val
 340 345 350

gct gac cgt cca gat gtc tta gct aag atc aga gaa gaa caa ttg gct 1104
 Ala Asp Arg Pro Asp Val Leu Ala Lys Ile Arg Glu Glu Gln Leu Ala
 355 360 365

gtt cgt aac aat gac atg tct acc gaa ttg aac ttg gat ttg att gag 1152
 Val Arg Asn Asn Asp Met Ser Thr Glu Leu Asn Leu Asp Leu Ile Glu
 370 375 380

aaa atg aag tac acc aat atg gtc ata aaa gaa act ttg cgt tac aga 1200
 Lys Met Lys Tyr Thr Asn Met Val Ile Lys Glu Thr Leu Arg Tyr Arg
 385 390 395 400

cct cct gtc ttg atg gtt cca tat gtt aag aag aat ttc cca gtt	1248
Pro Pro Val Leu Met Val Pro Tyr Val Val Lys Lys Asn Phe Pro Val	
405 410 415	
tcc cct aac tat acc gca cca aag ggc gct atg tta att cca acc tta	1296
Ser Pro Asn Tyr Thr Ala Pro Lys Gly Ala Met Leu Ile Pro Thr Leu	
420 425 430	
tac cca gct tta cat gat cct gaa gtt tac gaa aat cct gat gag ttc	1344
Tyr Pro Ala Leu His Asp Pro Glu Val Tyr Glu Asn Pro Asp Glu Phe	
435 440 445	
atc cct gaa aga tgg gta gaa ggc tct aag gct agt gaa gca aag aag	1392
Ile Pro Glu Arg Trp Val Glu Gly Ser Lys Ala Ser Glu Ala Lys Lys	
450 455 460	
aat tgg ttg gtt ttt ggt tgt ggt cca cac gtt tgc tta ggt caa aca	1440
Asn Trp Leu Val Phe Gly Cys Gly Pro His Val Cys Leu Gly Gln Thr	
465 470 475 480	
tat gtc atg att acc ttc gcc gct ttg ttg ggt aaa ttt gca cta tat	1488
Tyr Val Met Ile Thr Phe Ala Ala Leu Leu Gly Lys Phe Ala Leu Tyr	
485 490 495	
act gat ttc cat cat aca gtg act cca tta agt gaa aaa atc aag gtt	1536
Thr Asp Phe His His Thr Val Thr Pro Leu Ser Glu Lys Ile Lys Val	
500 505 510	
ttc gct aca att ttc cca aaa gat gat ttg tta ctg act ttc aaa aag	1584
Phe Ala Thr Ile Phe Pro Lys Asp Asp Leu Leu Thr Phe Lys Lys	
515 520 525	
aga gac cca att act gga gaa gtc ttc gaa taa	1617
Arg Asp Pro Ile Thr Gly Glu Val Phe Glu	
530 535	

<210> 22

<211> 538

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 22

Met Ser Ser Val Ala Glu Asn Ile Ile Gln His Ala Thr His Asn Ser	
1 5 10 15	

Thr Leu His Gln Leu Ala Lys Asp Gln Pro Ser Val Gly Val Thr Thr	
20 25 30	

Ala Phe Ser Ile Leu Asp Thr Leu Lys Ser Met Ser Tyr Leu Lys Ile	
35 40 45	

Phe Ala Thr Leu Ile Cys Ile Leu Leu Val Trp Asp Gln Val Ala Tyr	
50 55 60	

Gln Ile Lys Lys Gly Ser Ile Ala Gly Pro Lys Phe Lys Phe Trp Pro	
---	--

35

65	70	75	80
Ile Ile Gly Pro Phe Leu Glu Ser Leu Asp Pro Lys Phe Glu Glu Tyr			
	85	90	95
Lys Ala Lys Trp Ala Ser Gly Pro Leu Ser Cys Val Ser Ile Phe His			
	100	105	110
Lys Phe Val Val Ile Ala Ser Thr Arg Asp Leu Ala Arg Lys Ile Leu			
	115	120	125
Gln Ser Ser Lys Phe Val Lys Pro Cys Val Val Asp Val Ala Val Lys			
	130	135	140
Ile Leu Arg Pro Cys Asn Trp Val Phe Leu Asp Gly Lys Ala His Thr			
	145	150	160
Asp Tyr Arg Lys Ser Leu Asn Gly Leu Phe Thr Lys Gln Ala Leu Ala			
	165	170	175
Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Glu Gln Ile Met Asp Lys Tyr Met Asp Lys			
	180	185	190
Phe Val Arg Leu Ser Lys Glu Asn Asn Tyr Glu Pro Gln Val Phe Phe			
	195	200	205
His Glu Met Arg Glu Ile Leu Cys Ala Leu Ser Leu Asn Ser Phe Cys			
	210	215	220
Gly Asn Tyr Ile Thr Glu Asp Gln Val Arg Lys Ile Ala Asp Asp Tyr			
	225	230	240
Tyr Leu Val Thr Ala Ala Leu Glu Leu Val Asn Phe Pro Ile Ile Ile			
	245	250	255
Pro Tyr Thr Lys Thr Trp Tyr Gly Lys Lys Thr Ala Asp Met Ala Met			
	260	265	270
Lys Ile Phe Glu Asn Cys Ala Gln Met Ala Lys Asp His Ile Ala Ala			
	275	280	285
Gly Gly Lys Pro Val Cys Val Met Asp Ala Trp Cys Lys Leu Met His			
	290	295	300
Asp Ala Lys Asn Ser Asn Asp Asp Ser Arg Ile Tyr His Arg Glu			
	305	310	320
Phe Thr Asn Lys Glu Ile Ser Glu Ala Val Phe Thr Phe Leu Phe Ala			
	325	330	335
Ser Gln Asp Ala Ser Ser Ser Leu Ala Cys Trp Leu Phe Gln Ile Val			
	340	345	350
Ala Asp Arg Pro Asp Val Leu Ala Lys Ile Arg Glu Glu Gln Leu Ala			
	355	360	365
Val Arg Asn Asn Asp Met Ser Thr Glu Leu Asn Leu Asp Leu Ile Glu			

370	375	380
-----	-----	-----

Lys Met Lys Tyr Thr Asn Met Val Ile Lys Glu Thr Leu Arg Tyr Arg	390	395
		400

Pro Pro Val Leu Met Val Pro Tyr Val Val Lys Lys Asn Phe Pro Val	405	410
		415

Ser Pro Asn Tyr Thr Ala Pro Lys Gly Ala Met Leu Ile Pro Thr Leu	420	425
		430

Tyr Pro Ala Leu His Asp Pro Glu Val Tyr Glu Asn Pro Asp Glu Phe	435	440
		445

Ile Pro Glu Arg Trp Val Glu Gly Ser Lys Ala Ser Glu Ala Lys Lys	450	455
		460

Asn Trp Leu Val Phe Gly Cys Gly Pro His Val Cys Leu Gly Gln Thr	465	470
		475
		480

Tyr Val Met Ile Thr Phe Ala Ala Leu Leu Gly Lys Phe Ala Leu Tyr	485	490
		495

Thr Asp Phe His His Thr Val Thr Pro Leu Ser Glu Lys Ile Lys Val	500	505
		510

Phe Ala Thr Ile Phe Pro Lys Asp Asp Leu Leu Leu Thr Phe Lys Lys	515	520
		525

Arg Asp Pro Ile Thr Gly Glu Val Phe Glu	530	535
---	-----	-----

<210> 23

<211> 1578

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: trunkierte
HMG

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1578)

<400> 23

atg gac caa ttg gtg aaa act gaa gtc acc aag aag tct ttt act gct	5	10
Met Asp Gln Leu Val Lys Thr Glu Val Thr Lys Lys Ser Phe Thr Ala		15
1		

cct gta caa aag gct tct aca cca gtt tta acc aat aaa aca gtc att	20	25
Pro Val Gln Lys Ala Ser Thr Pro Val Leu Thr Asn Lys Thr Val Ile		30

tct gga tcg aaa gtc aaa agt tta tca tct gcg caa tcg agc tca tca	25	30
Ser Gly Ser Lys Val Lys Ser Leu Ser Ser Ala Gln Ser Ser Ser Ser		144

35

40

45

gga cct tca tca tct agt gag gaa gat gat tcc cgc gat att gaa agc	192		
Gly Pro Ser Ser Ser Ser Glu Glu Asp Asp Ser Arg Asp Ile Glu Ser			
50	55	60	
ttg gat aag aaa ata cgt cct tta gaa gaa gca tta tta agt	240		
Leu Asp Lys Lys Ile Arg Pro Leu Glu Glu Leu Glu Ala Leu Leu Ser			
65	70	75	80
agt gga aat aca aaa caa ttg aag aac aaa gag gtc gct gcc ttg gtt	288		
Ser Gly Asn Thr Lys Gln Leu Lys Asn Lys Glu Val Ala Ala Leu Val			
85	90	95	
att cac ggt aag tta cct ttg tac gct ttg gag aaa aaa tta ggt gat	336		
Ile His Gly Lys Leu Pro Leu Tyr Ala Leu Glu Lys Lys Leu Gly Asp			
100	105	110	
act acg aga gcg gtt gcg gta cgt agg aag gct ctt tca att ttg gca	384		
Thr Thr Arg Ala Val Ala Val Arg Arg Lys Ala Leu Ser Ile Leu Ala			
115	120	125	
gaa gct cct gta tta gca tct gat cgt tta cca tat aaa aat tat gac	432		
Glu Ala Pro Val Leu Ala Ser Asp Arg Leu Pro Tyr Lys Asn Tyr Asp			
130	135	140	
tac gac cgc gta ttt ggc gct tgt tgt gaa aat gtt ata ggt tac atg	480		
Tyr Asp Arg Val Phe Gly Ala Cys Cys Glu Asn Val Ile Gly Tyr Met			
145	150	155	160
cct ttg ccc gtt ggt gtt ata ggc ccc ttg gtt atc gat ggt aca tct	528		
Pro Leu Pro Val Gly Val Ile Gly Pro Leu Val Ile Asp Gly Thr Ser			
165	170	175	
tat cat ata cca atg gca act aca gag ggt tgt ttg gta gct tct gcc	576		
Tyr His Ile Pro Met Ala Thr Thr Glu Gly Cys Leu Val Ala Ser Ala			
180	185	190	
atg cgt ggc tgt aag gca atc aat gct ggc ggt gca aca act gtt	624		
Met Arg Gly Cys Lys Ala Ile Asn Ala Gly Gly Ala Thr Thr Val			
195	200	205	
tta act aag gat ggt atg aca aga ggc cca gta gtc cgt ttc cca act	672		
Leu Thr Lys Asp Gly Met Thr Arg Gly Pro Val Val Arg Phe Pro Thr			
210	215	220	
ttg aaa aga tct ggt gcc tgt aag ata tgg tta gac tca gaa gag gga	720		
Leu Lys Arg Ser Gly Ala Cys Lys Ile Trp Leu Asp Ser Glu Glu Gly			
225	230	235	240
caa aac gca att aaa aaa gct ttt aac tct aca tca aga ttt gca cgt	768		
Gln Asn Ala Ile Lys Lys Ala Phe Asn Ser Thr Ser Arg Phe Ala Arg			
245	250	255	
ctg caa cat att caa act tgt cta gca gga gat tta ctc ttc atg aga	816		
Leu Gln His Ile Gln Thr Cys Leu Ala Gly Asp Leu Leu Phe Met Arg			
260	265	270	

ttt aga aca act act ggt gac gca atg ggt atg aat atg att tct aaa		864
Phe Arg Thr Thr Thr Gly Asp Ala Met Gly Met Asn Met Ile Ser Lys		
275	280	285
ggc gtc gaa tac tca tta aag caa atg gta gaa gag tat ggc tgg gaa		912
Gly Val Glu Tyr Ser Leu Lys Gln Met Val Glu Glu Tyr Gly Trp Glu		
290	295	300
gat atg gag gtt gtc tcc gtt tct ggt aac tac tgt acc gac aaa aaa		960
Asp Met Glu Val Val Ser Val Ser Gly Asn Tyr Cys Thr Asp Lys Lys		
305	310	315
cca gct gcc atc aac tgg atc gaa ggt cgt ggt aag agt gtc gtc gca		1008
Pro Ala Ala Ile Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val Ala		
325	330	335
gaa gct act att cct ggt gat gtc aga aaa gtg tta aaa agt gat		1056
Glu Ala Thr Ile Pro Gly Asp Val Val Arg Lys Val Leu Lys Ser Asp		
340	345	350
gtt tcc gca ttg gtt gag ttg aac att gct aag aat ttg gtt gga tct		1104
Val Ser Ala Leu Val Glu Leu Asn Ile Ala Lys Asn Leu Val Gly Ser		
355	360	365
gca atg gct ggg tct gtt ggt gga ttt aac gca cat gca gct aat tta		1152
Ala Met Ala Gly Ser Val Gly Gly Phe Asn Ala His Ala Ala Asn Leu		
370	375	380
gtg aca gct gtt ttc ttg gca tta gga caa gat cct gca caa aat gtt		1200
Val Thr Ala Val Phe Leu Ala Leu Gly Gln Asp Pro Ala Gln Asn Val		
385	390	395
gaa agt tcc aac tgt ata aca ttg atg aaa gaa gtg gac ggt gat ttg		1248
Glu Ser Ser Asn Cys Ile Thr Leu Met Lys Glu Val Asp Gly Asp Leu		
405	410	415
aga att tcc gta tcc atg cca tcc atc gaa gta ggt acc atc ggt		1296
Arg Ile Ser Val Ser Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Ile Gly Gly		
420	425	430
ggc act gtt cta gaa cca caa ggt gcc atg ttg gac tta tta ggt gta		1344
Gly Thr Val Leu Glu Pro Gln Gly Ala Met Leu Asp Leu Leu Gly Val		
435	440	445
aga ggc ccg cat gct acc gct cct ggt acc aac gca cgt caa tta gca		1392
Arg Gly Pro His Ala Thr Ala Pro Gly Thr Asn Ala Arg Gln Leu Ala		
450	455	460
aga ata gtt gcc tgt gcc gtc ttg gca ggt gaa tta tcc tta tgt gct		1440
Arg Ile Val Ala Cys Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Cys Ala		
465	470	475
gcc cta gca gcc ggc cat ttg gtt caa agt cat atg acc cac aac agg		1488
Ala Leu Ala Ala Gly His Leu Val Gln Ser His Met Thr His Asn Arg		
485	490	495

aaa cct gct gaa cca aca aaa cct aac aat ttg gac gcc act gat ata 1536
 Lys Pro Ala Glu Pro Thr Lys Pro Asn Asn Leu Asp Ala Thr Asp Ile
 500 505 510

aat cgt ttg aaa gat ggg tcc gtc acc tgc att aaa tcc taa 1578
 Asn Arg Leu Lys Asp Gly Ser Val Thr Cys Ile Lys Ser
 515 520 525

<210> 24
<211> 525
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 24
Met Asp Gln Leu Val Lys Thr Glu Val Thr Lys Lys Ser Phe Thr Ala
1 5 10 15

Pro Val Gln Lys Ala Ser Thr Pro Val Leu Thr Asn Lys Thr Val Ile
20 25 30

Ser Gly Ser Lys Val Lys Ser Leu Ser Ser Ala Gln Ser Ser Ser Ser
35 40 45

Gly Pro Ser Ser Ser Ser Glu Glu Asp Asp Ser Arg Asp Ile Glu Ser
50 55 60

Leu Asp Lys Lys Ile Arg Pro Leu Glu Glu Leu Glu Ala Leu Leu Ser
65 70 75 80

Ser Gly Asn Thr Lys Gln Leu Lys Asn Lys Glu Val Ala Ala Leu Val
85 90 95

Ile His Gly Lys Leu Pro Leu Tyr Ala Leu Glu Lys Lys Leu Gly Asp
100 105 110

Thr Thr Arg Ala Val Ala Val Arg Arg Lys Ala Leu Ser Ile Leu Ala
115 120 125

Glu Ala Pro Val Leu Ala Ser Asp Arg Leu Pro Tyr Lys Asn Tyr Asp
130 135 140

Tyr Asp Arg Val Phe Gly Ala Cys Cys Glu Asn Val Ile Gly Tyr Met
145 150 155 160

Pro Leu Pro Val Gly Val Ile Gly Pro Leu Val Ile Asp Gly Thr Ser
165 170 175

Tyr His Ile Pro Met Ala Thr Thr Glu Gly Cys Leu Val Ala Ser Ala
180 185 190

Met Arg Gly Cys Lys Ala Ile Asn Ala Gly Gly Ala Thr Thr Val
195 200 205

Leu Thr Lys Asp Gly Met Thr Arg Gly Pro Val Val Arg Phe Pro Thr
210 215 220

Leu Lys Arg Ser Gly Ala Cys Lys Ile Trp Leu Asp Ser Glu Glu Gly
225 230 235 240

Gln Asn Ala Ile Lys Lys Ala Phe Asn Ser Thr Ser Arg Phe Ala Arg
245 250 255

Leu Gln His Ile Gln Thr Cys Leu Ala Gly Asp Leu Leu Phe Met Arg
260 265 270

Phe Arg Thr Thr Gly Asp Ala Met Gly Met Asn Met Ile Ser Lys
275 280 285

Gly Val Glu Tyr Ser Leu Lys Gln Met Val Glu Glu Tyr Gly Trp Glu
290 295 300

Asp Met Glu Val Val Ser Val Ser Gly Asn Tyr Cys Thr Asp Lys Lys
305 310 315 320

Pro Ala Ala Ile Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val Ala
325 330 335

Glu Ala Thr Ile Pro Gly Asp Val Val Arg Lys Val Leu Lys Ser Asp
340 345 350

Val Ser Ala Leu Val Glu Leu Asn Ile Ala Lys Asn Leu Val Gly Ser
355 360 365

Ala Met Ala Gly Ser Val Gly Gly Phe Asn Ala His Ala Ala Asn Leu
370 375 380

Val Thr Ala Val Phe Leu Ala Leu Gly Gln Asp Pro Ala Gln Asn Val
385 390 395 400

Glu Ser Ser Asn Cys Ile Thr Leu Met Lys Glu Val Asp Gly Asp Leu
405 410 415

Arg Ile Ser Val Ser Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Ile Gly Gly
420 425 430

Gly Thr Val Leu Glu Pro Gln Gly Ala Met Leu Asp Leu Leu Gly Val
435 440 445

Arg Gly Pro His Ala Thr Ala Pro Gly Thr Asn Ala Arg Gln Leu Ala
450 455 460

Arg Ile Val Ala Cys Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Cys Ala
465 470 475 480

Ala Leu Ala Ala Gly His Leu Val Gln Ser His Met Thr His Asn Arg
485 490 495

Lys Pro Ala Glu Pro Thr Lys Pro Asn Asn Leu Asp Ala Thr Asp Ile
500 505 510

Asn Arg Leu Lys Asp Gly Ser Val Thr Cys Ile Lys Ser
515 520 525

<210> 25
 <211> 1593
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1593)

 <400> 25 48
 atg tct gct acc aag tca atc gtt gga gag gca ttg gaa tac gta aac
 Met Ser Ala Thr Lys Ser Ile Val Gly Glu Ala Leu Glu Tyr Val Asn
 1 5 10 15

 att ggt tta agt cat ttc ttg gct tta cca ttg gcc caa aga atc tct 96
 Ile Gly Leu Ser His Phe Leu Ala Leu Pro Leu Ala Gln Arg Ile Ser
 20 25 30

 ttg atc ata ata att cct ttc att tac aat att gta tgg caa tta cta 144
 Leu Ile Ile Ile Pro Phe Ile Tyr Asn Ile Val Trp Gln Leu Leu
 35 40 45

 tat tct ttg aga aag gac cgt cca cct cta gtg ttt tac tgg att cca 192
 Tyr Ser Leu Arg Lys Asp Arg Pro Pro Leu Val Phe Tyr Trp Ile Pro
 50 55 60

 tgg gtc ggt agt gct gtt gtg tac ggt atg aag cca tac gag ttt ttc 240
 Trp Val Gly Ser Ala Val Val Tyr Gly Met Lys Pro Tyr Glu Phe Phe
 65 70 75 80

 gaa gaa tgt caa aag aaa tac ggt gat att ttt tca ttc gtt ttg tta 288
 Glu Glu Cys Gln Lys Lys Tyr Gly Asp Ile Phe Ser Phe Val Leu Leu
 85 90 95

 gga aga gtc atg act gtg tat tta gga cca aag ggt cac gaa ttt gtc 336
 Gly Arg Val Met Thr Val Tyr Leu Gly Pro Lys Gly His Glu Phe Val
 100 105 110

 ttc aac gct aag ttg gca gat gtt tca gca gaa gct gct tac gct cat 384
 Phe Asn Ala Lys Leu Ala Asp Val Ser Ala Glu Ala Ala Tyr Ala His
 115 120 125

 ttg act act cca gtt ttc ggt aaa ggt gtt att tac gat tgt cca aat 432
 Leu Thr Thr Pro Val Phe Gly Lys Gly Val Ile Tyr Asp Cys Pro Asn
 130 135 140

 tct aga ttg atg gag caa aag aag ttt gtt aag ggt gct cta acc aaa 480
 Ser Arg Leu Met Glu Gln Lys Lys Phe Val Lys Gly Ala Leu Thr Lys
 145 150 155 160

 gaa gcc ttc aag agc tac gtt cca ttg att gct gaa gaa gtg tac aag 528
 Glu Ala Phe Lys Ser Tyr Val Pro Leu Ile Ala Glu Glu Val Tyr Lys
 165 170 175

 tac ttc aga gac tcc aaa aac ttc cgt ttg aat gaa aga act act ggt 576
 Tyr Phe Arg Asp Ser Lys Asn Phe Arg Leu Asn Glu Arg Thr Thr Gly

180

185

190

act att gac gtg atg gtt act caa cct gaa atg act att ttc acc gct 624
 Thr Ile Asp Val Met Val Thr Gln Pro Glu Met Thr Ile Phe Thr Ala
 195 200 205

tca aga tca tta ttg ggt aag gaa atg aga gca aaa ttg gat acc gat 672
 Ser Arg Ser Leu Leu Gly Lys Glu Met Arg Ala Lys Leu Asp Thr Asp
 210 215 220

ttt gct tac ttg tac agt gat ttg gat aag ggt ttc act cca atc aac 720
 Phe Ala Tyr Leu Tyr Ser Asp Leu Asp Lys Gly Phe Thr Pro Ile Asn
 225 230 235 240

ttc gtc ttc cct aac tta cca ttg gaa cac tat aga aag aga gat cac 768
 Phe Val Phe Pro Asn Leu Pro Leu Glu His Tyr Arg Lys Arg Asp His
 245 250 255

gct caa aag gct atc tcc ggt act tac atg tct ttg att aag gaa aga 816
 Ala Gln Lys Ala Ile Ser Gly Thr Tyr Met Ser Leu Ile Lys Glu Arg
 260 265 270

aga aag aac aac gac att caa gac aga gat ttg atc gat tcc ttg atg 864
 Arg Lys Asn Asn Asp Ile Gln Asp Arg Asp Leu Ile Asp Ser Leu Met
 275 280 285

aag aac tct acc tac aag gat ggt gtg aag atg act gat caa gaa atc 912
 Lys Asn Ser Thr Tyr Lys Asp Gly Val Lys Met Thr Asp Gln Glu Ile
 290 295 300

gct aac ttg tta att ggt gtc tta atg ggt ggt caa cat act tct gct 960
 Ala Asn Leu Leu Ile Gly Val Leu Met Gly Gly Gln His Thr Ser Ala
 305 310 315 320

gcc act tct gct tgg att ttg ttg cac ttg gct gaa aga cca gat gtc 1008
 Ala Thr Ser Ala Trp Ile Leu Leu His Leu Ala Glu Arg Pro Asp Val
 325 330 335

caa caa gaa ttg tac gaa gaa caa atg cgt gtt ttg gat ggt ggt aag 1056
 Gln Gln Glu Leu Tyr Glu Glu Gln Met Arg Val Leu Asp Gly Gly Lys
 340 345 350

aag gaa ttg acc tac gat tta tta caa gaa atg cca ttg ttg aac caa 1104
 Lys Glu Leu Thr Tyr Asp Leu Leu Gln Glu Met Pro Leu Leu Asn Gln
 355 360 365

act att aag gaa act cta aga atg cac cat cca ttg cac tct ttg ttc 1152
 Thr Ile Lys Glu Thr Leu Arg Met His His Pro Leu His Ser Leu Phe
 370 375 380

cgt aag gtt atg aaa gat atg cac gtt cca aac act tct tat gtc atc 1200
 Arg Lys Val Met Lys Asp Met His Val Pro Asn Thr Ser Tyr Val Ile
 385 390 395 400

cca gca ggt tat cac gtt ttg tct cca ggt tac act cat tta aga 1248
 Pro Ala Gly Tyr His Val Leu Val Ser Pro Gly Tyr Thr His Leu Arg
 405 410 415

gac gaa tac ttc cct aat gct cac caa ttc aac att cac cgt tgg aac 1296
 Asp Glu Tyr Phe Pro Asn Ala His Gln Phe Asn Ile His Arg Trp Asn
 420 425 430

 aaa gat tct gcc tcc tat tcc gtc ggt gaa gaa gtc gat tac ggt 1344
 Lys Asp Ser Ala Ser Ser Tyr Ser Val Gly Glu Val Asp Tyr Gly
 435 440 445

 ttc ggt gcc att tct aag ggt gtc agc tct cca tac tta cct ttc ggt 1392
 Phe Gly Ala Ile Ser Lys Gly Val Ser Ser Pro Tyr Leu Pro Phe Gly
 450 455 460

 ggt ggt aga cac aga tgt atc ggt gaa cac ttt gct tac tgt cag cta 1440
 Gly Gly Arg His Arg Cys Ile Gly Glu His Phe Ala Tyr Cys Gln Leu
 465 470 475 480

 ggt gtt cta atg tcc att ttt atc aga aca tta aaa tgg cat tac cca 1488
 Gly Val Leu Met Ser Ile Phe Ile Arg Thr Leu Lys Trp His Tyr Pro
 485 490 495

 gag ggt aag acc gtt cca cct gac ttt aca tct atg gtt act ctt 1536
 Glu Gly Lys Thr Val Pro Pro Pro Asp Phe Thr Ser Met Val Thr Leu
 500 505 510

 cca acc ggt cca gcc aag atc atc tgg gaa aag aga aat cca gaa caa 1584
 Pro Thr Gly Pro Ala Lys Ile Ile Trp Glu Lys Arg Asn Pro Glu Gln
 515 520 525

 aag atc taa 1593
 Lys Ile
 530

<210> 26
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 26
 Met Ser Ala Thr Lys Ser Ile Val Gly Glu Ala Leu Glu Tyr Val Asn
 1 5 10 15

 Ile Gly Leu Ser His Phe Leu Ala Leu Pro Leu Ala Gln Arg Ile Ser
 20 25 30

 Leu Ile Ile Ile Ile Pro Phe Ile Tyr Asn Ile Val Trp Gln Leu Leu
 35 40 45

 Tyr Ser Leu Arg Lys Asp Arg Pro Pro Leu Val Phe Tyr Trp Ile Pro
 50 55 60

 Trp Val Gly Ser Ala Val Val Tyr Gly Met Lys Pro Tyr Glu Phe Phe
 65 70 75 80

 Glu Glu Cys Gln Lys Lys Tyr Gly Asp Ile Phe Ser Phe Val Leu Leu
 85 90 95

Gly Arg Val Met Thr Val Tyr Leu Gly Pro Lys Gly His Glu Phe Val
 100 105 110

Phe Asn Ala Lys Leu Ala Asp Val Ser Ala Glu Ala Ala Tyr Ala His
 115 120 125

Leu Thr Thr Pro Val Phe Gly Lys Gly Val Ile Tyr Asp Cys Pro Asn
 130 135 140

Ser Arg Leu Met Glu Gln Lys Lys Phe Val Lys Gly Ala Leu Thr Lys
 145 150 155 160

Glu Ala Phe Lys Ser Tyr Val Pro Leu Ile Ala Glu Glu Val Tyr Lys
 165 170 175

Tyr Phe Arg Asp Ser Lys Asn Phe Arg Leu Asn Glu Arg Thr Thr Gly
 180 185 190

Thr Ile Asp Val Met Val Thr Gln Pro Glu Met Thr Ile Phe Thr Ala
 195 200 205

Ser Arg Ser Leu Leu Gly Lys Glu Met Arg Ala Lys Leu Asp Thr Asp
 210 215 220 240

Phe Ala Tyr Leu Tyr Ser Asp Leu Asp Lys Gly Phe Thr Pro Ile Asn
 225 230 235 240

Phe Val Phe Pro Asn Leu Pro Leu Glu His Tyr Arg Lys Arg Asp His
 245 250 255

Ala Gln Lys Ala Ile Ser Gly Thr Tyr Met Ser Leu Ile Lys Glu Arg
 260 265 270

Arg Lys Asn Asn Asp Ile Gln Asp Arg Asp Leu Ile Asp Ser Leu Met
 275 280 285

Lys Asn Ser Thr Tyr Lys Asp Gly Val Lys Met Thr Asp Gln Glu Ile
 290 295 300

Ala Asn Leu Leu Ile Gly Val Leu Met Gly Gly Gln His Thr Ser Ala
 305 310 315 320

Ala Thr Ser Ala Trp Ile Leu Leu His Leu Ala Glu Arg Pro Asp Val
 325 330 335

Gln Gln Glu Leu Tyr Glu Glu Gln Met Arg Val Leu Asp Gly Gly Lys
 340 345 350

Lys Glu Leu Thr Tyr Asp Leu Leu Gln Glu Met Pro Leu Leu Asn Gln
 355 360 365

Thr Ile Lys Glu Thr Leu Arg Met His His Pro Leu His Ser Leu Phe
 370 375 380

Arg Lys Val Met Lys Asp Met His Val Pro Asn Thr Ser Tyr Val Ile
 385 390 395 400

Pro Ala Gly Tyr His Val Leu Val Ser Pro Gly Tyr Thr His Leu Arg
 405 410 415

Asp Glu Tyr Phe Pro Asn Ala His Gln Phe Asn Ile His Arg Trp Asn
 420 425 430

Lys Asp Ser Ala Ser Ser Tyr Ser Val Gly Glu Glu Val Asp Tyr Gly
 435 440 445

Phe Gly Ala Ile Ser Lys Gly Val Ser Ser Pro Tyr Leu Pro Phe Gly
 450 455 460

Gly Gly Arg His Arg Cys Ile Gly Glu His Phe Ala Tyr Cys Gln Leu
 465 470 475 480

Gly Val Leu Met Ser Ile Phe Ile Arg Thr Leu Lys Trp His Tyr Pro
 485 490 495

Glu Gly Lys Thr Val Pro Pro Asp Phe Thr Ser Met Val Thr Leu
 500 505 510

Pro Thr Gly Pro Ala Lys Ile Ile Trp Glu Lys Arg Asn Pro Glu Gln
 515 520 525

Lys Ile
 530

<210> 27

<211> 1491

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1491)

<400> 27

atg tct gct gtt aac gtt gca cct gaa ttg att aat gcc gac aac aca	48
Met Ser Ala Val Asn Val Ala Pro Glu Leu Ile Asn Ala Asp Asn Thr	
1 5 10 15	

att acc tac gat gcg att gtc atc ggt gct ggt gtt atc ggt cca tgt	96
Ile Thr Tyr Asp Ala Ile Val Ile Gly Ala Gly Val Ile Gly Pro Cys	
20 25 30	

gtt gct act ggt cta gca aga aag ggt aag aaa gtt ctt atc gta gaa	144
Val Ala Thr Gly Leu Ala Arg Lys Gly Lys Lys Val Leu Ile Val Glu	
35 40 45	

cgt gac tgg gct atg cct gat aga att gtt ggt gaa ttg atg caa cca	192
Arg Asp Trp Ala Met Pro Asp Arg Ile Val Gly Glu Leu Met Gln Pro	
50 55 60	

ggt ggt gtt aga gca ttg aga agt ctg ggt atg att caa tct atc aac	240
Gly Gly Val Arg Ala Leu Arg Ser Leu Gly Met Ile Gln Ser Ile Asn	

65	70	75	80	
aac atc gaa gca tat cct gtt acc ggt tat acc gtc ttt ttc aac ggc Asn Ile Glu Ala Tyr Pro Val Thr Gly Tyr Thr Val Phe Phe Asn Gly 85		90		288
			95	
gaa caa gtt gat att cca tac cct tac aag gcc gat atc cct aaa gtt Glu Gln Val Asp Ile Pro Tyr Pro Tyr Lys Ala Asp Ile Pro Lys Val 100		105	110	336
gaa aaa ttg aag gac ttg gtc aaa gat ggt aat gac aag gtc ttg gaa Glu Lys Leu Lys Asp Leu Val Lys Asp Gly Asn Asp Lys Val Leu Glu 115		120	125	384
gac agc act att cac atc aag gat tac gaa gat gat gaa aga gaa agg Asp Ser Thr Ile His Ile Lys Asp Tyr Glu Asp Asp Glu Arg Glu Arg 130		135	140	432
ggt gtt gct ttt gtt cat ggt aga ttc ttg aac aac ttg aga aac att Gly Val Ala Phe Val His Gly Arg Phe Leu Asn Asn Leu Arg Asn Ile 145		150	155	480
			160	
act gct caa gag cca aat gtt act aga gtg caa ggt aac tgt att gag Thr Ala Gln Glu Pro Asn Val Thr Arg Val Gln Gly Asn Cys Ile Glu 165		170	175	528
ata ttg aag gat gaa aag aat gag gtt gtt ggt gcc aag gtt gac att Ile Leu Lys Asp Glu Lys Asn Glu Val Val Gly Ala Lys Val Asp Ile 180		185	190	576
gat ggc cgt ggc aag gtg gaa ttc aaa gcc cac ttg aca ttt atc tgt Asp Gly Arg Gly Lys Val Glu Phe Lys Ala His Leu Thr Phe Ile Cys 195		200	205	624
gac ggt atc ttt tca cgt ttc aga aag gaa ttg cac cca gac cat gtt Asp Gly Ile Phe Ser Arg Phe Arg Lys Glu Leu His Pro Asp His Val 210		215	220	672
cca act gtc ggt tct tcg ttt gtc ggt atg tct ttg ttc aat gct aag Pro Thr Val Gly Ser Ser Phe Val Gly Met Ser Leu Phe Asn Ala Lys 225		230	235	720
			240	
aat cct gct cct atg cac ggt cac gtt att ctt ggt agt gat cat atg Asn Pro Ala Pro Met His Gly His Val Ile Leu Gly Ser Asp His Met 245		250	255	768
cca atc ttg gtt tac caa atc agt cca gaa gaa aca aga atc ctt tgt Pro Ile Leu Val Tyr Gln Ile Ser Pro Glu Glu Thr Arg Ile Leu Cys 260		265	270	816
gct tac aac tct cca aag gtc cca gct gat atc aag agt tgg atg att Ala Tyr Asn Ser Pro Lys Val Pro Ala Asp Ile Lys Ser Trp Met Ile 275		280	285	864
aag gat gtc caa cct ttc att cca aag agt cta cgt cct tca ttt gat Lys Asp Val Gln Pro Phe Ile Pro Lys Ser Leu Arg Pro Ser Phe Asp 290		295	300	912

gaa gcc gtc agc caa ggt aaa ttt aga gct atg cca aac tcc tac ttg	960
Glu Ala Val Ser Gln Gly Lys Phe Arg Ala Met Pro Asn Ser Tyr Leu	
305 310 315 320	
cca gct aga caa aac gac gtc act ggt atg tgt gtt atc ggt gac gct	1008
Pro Ala Arg Gln Asn Asp Val Thr Gly Met Cys Val Ile Gly Asp Ala.	
325 330 335	
cta aat atg aga cat cca ttg act ggt ggt atg act gtc ggt ttg	1056
Leu Asn Met Arg His Pro Leu Thr Gly Gly Met Thr Val Gly Leu	
340 345 350	
cat gat gtt gtc ttg ttg att aag aaa ata ggt gac cta gac ttc agc	1104
His Asp Val Val Leu Leu Ile Lys Lys Ile Gly Asp Leu Asp Phe Ser	
355 360 365	
gac cgt gaa aag gtt ttg gat gaa tta cta gac tac cat ttc gaa aga	1152
Asp Arg Glu Lys Val Leu Asp Glu Leu Leu Asp Tyr His Phe Glu Arg	
370 375 380	
aag agt tac gat tcc gtt att aac gtt ttg tca gtg gct ttg tat tct	1200
Lys Ser Tyr Asp Ser Val Ile Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Tyr Ser	
385 390 395 400	
ttg ttc gct gct gac agc gat aac ttg aag gca tta caa aaa ggt tgt	1248
Leu Phe Ala Ala Asp Ser Asp Asn Leu Lys Ala Leu Gln Lys Gly Cys	
405 410 415	
ttc aaa tat ttc caa aga ggt ggc gat tgt gtc aac aaa ccc gtt gaa	1296
Phe Lys Tyr Phe Gln Arg Gly Asp Cys Val Asn Lys Pro Val Glu	
420 425 430	
ttt ctg tct ggt gtc ttg cca aag cct ttg caa ttg acc agg gtt ttc	1344
Phe Leu Ser Gly Val Leu Pro Lys Pro Leu Gln Leu Thr Arg Val Phe	
435 440 445	
ttc gct gtc gct ttt tac acc att tac ttg aac atg gaa gaa cgt ggt	1392
Phe Ala Val Ala Phe Tyr Thr Ile Tyr Leu Asn Met Glu Glu Arg Gly	
450 455 460	
ttc ttg gga tta cca atg gct tta ttg gaa ggt att atg att ttg atc	1440
Phe Leu Gly Leu Pro Met Ala Leu Leu Glu Gly Ile Met Ile Leu Ile	
465 470 475 480	
aca gct att aga gta ttc acc cca ttt ttg ttt ggt gag ttg att ggt	1488
Thr Ala Ile Arg Val Phe Thr Pro Phe Leu Phe Gly Glu Leu Ile Gly	
485 490 495	
taa	1491

<210> 28
 <211> 496
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 28

Met	Ser	Ala	Val	Asn	Val	Ala	Pro	Glu	Leu	Ile	Asn	Ala	Asp	Asn	Thr
1					5				10						15
Ile Thr Tyr Asp Ala Ile Val Ile Gly Ala Gly Val Ile Gly Pro Cys															
			20			25									30
Val Ala Thr Gly Leu Ala Arg Lys Gly Lys Lys Val Leu Ile Val Glu															
			35			40									45
Arg Asp Trp Ala Met Pro Asp Arg Ile Val Gly Glu Leu Met Gln Pro															
			50			55									60
Gly Gly Val Arg Ala Leu Arg Ser Leu Gly Met Ile Gln Ser Ile Asn															
			65			70			75						80
Asn Ile Glu Ala Tyr Pro Val Thr Gly Tyr Thr Val Phe Phe Asn Gly															
			85			90									95
Glu Gln Val Asp Ile Pro Tyr Pro Tyr Lys Ala Asp Ile Pro Lys Val															
			100			105									110
Glu Lys Leu Lys Asp Leu Val Lys Asp Gly Asn Asp Lys Val Leu Glu															
			115			120									125
Asp Ser Thr Ile His Ile Lys Asp Tyr Glu Asp Asp Glu Arg Glu Arg															
			130			135									140
Gly Val Ala Phe Val His Gly Arg Phe Leu Asn Asn Leu Arg Asn Ile															
			145			150			155						160
Thr Ala Gln Glu Pro Asn Val Thr Arg Val Gln Gly Asn Cys Ile Glu															
			165			170									175
Ile Leu Lys Asp Glu Lys Asn Glu Val Val Gly Ala Lys Val Asp Ile															
			180			185									190
Asp Gly Arg Gly Lys Val Glu Phe Lys Ala His Leu Thr Phe Ile Cys															
			195			200									205
Asp Gly Ile Phe Ser Arg Phe Arg Lys Glu Leu His Pro Asp His Val															
			210			215			220						
Pro Thr Val Gly Ser Ser Phe Val Gly Met Ser Leu Phe Asn Ala Lys															
			225			230			235						240
Asn Pro Ala Pro Met His Gly His Val Ile Leu Gly Ser Asp His Met															
			245			250									255
Pro Ile Leu Val Tyr Gln Ile Ser Pro Glu Glu Thr Arg Ile Leu Cys															
			260			265									270
Ala Tyr Asn Ser Pro Lys Val Pro Ala Asp Ile Lys Ser Trp Met Ile															
			275			280									285
Lys Asp Val Gln Pro Phe Ile Pro Lys Ser Leu Arg Pro Ser Phe Asp															

290	295	300
Glu Ala Val Ser Gln Gly Lys Phe Arg Ala Met Pro Asn Ser Tyr Leu		
305	310	315
Pro Ala Arg Gln Asn Asp Val Thr Gly Met Cys Val Ile Gly Asp Ala		
325	330	335
Leu Asn Met Arg His Pro Leu Thr Gly Gly Met Thr Val Gly Leu		
340	345	350
His Asp Val Val Leu Leu Ile Lys Lys Ile Gly Asp Leu Asp Phe Ser		
355	360	365
Asp Arg Glu Lys Val Leu Asp Glu Leu Leu Asp Tyr His Phe Glu Arg		
370	375	380
Lys Ser Tyr Asp Ser Val Ile Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Tyr Ser		
385	390	395
Leu Phe Ala Ala Asp Ser Asp Asn Leu Lys Ala Leu Gln Lys Gly Cys		
405	410	415
Phe Lys Tyr Phe Gln Arg Gly Gly Asp Cys Val Asn Lys Pro Val Glu		
420	425	430
Phe Leu Ser Gly Val Leu Pro Lys Pro Leu Gln Leu Thr Arg Val Phe		
435	440	445
Phe Ala Val Ala Phe Tyr Thr Ile Tyr Leu Asn Met Glu Glu Arg Gly		
450	455	460
Phe Leu Gly Leu Pro Met Ala Leu Leu Glu Gly Ile Met Ile Leu Ile		
465	470	475
Thr Ala Ile Arg Val Phe Thr Pro Phe Leu Phe Gly Glu Leu Ile Gly		
485	490	495
<210> 29		
<211> 1335		
<212> DNA		
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
<220>		
<221> CDS		
<222> (1)..(1335)		
<400> 29		
atg gga aag cta tta caa ttg gca ttg cat ccg gtc gag atg aag gca		48
Met Gly Lys Leu Leu Gln Leu Ala Leu His Pro Val Glu Met Lys Ala		
1	5	10
15		
<400> 29		
gct ttg aag ctg aag ttt tgc aga aca ccg cta ttc tcc atc tat gat		96
Ala Leu Lys Leu Lys Phe Cys Arg Thr Pro Leu Phe Ser Ile Tyr Asp		
20	25	30

cag tcc acg tct cca tat ctc ttg cac tgt ttc gaa ctg ttg aac ttg	144		
Gln Ser Thr Ser Pro Tyr Leu Leu His Cys Phe Glu Leu Leu Asn Leu			
35	40	45	
acc tcc aga tcg ttt gct gct gtg atc aga gag ctg cat cca gaa ttg	192		
Thr Ser Arg Ser Phe Ala Ala Val Ile Arg Glu Leu His Pro Glu Leu			
50	55	60	
aga aac tgt gtt act ctc ttt tat ttg att tta agg gct ttg gat acc	240		
Arg Asn Cys Val Thr Leu Phe Tyr Leu Ile Leu Arg Ala Leu Asp Thr			
65	70	75	80
atc gaa gac gat atg tcc atc gaa cac gat ttg aaa att gac ttg ttg	288		
Ile Glu Asp Asp Met Ser Ile Glu His Asp Leu Lys Ile Asp Leu Leu			
85	90	95	
cgt cac ttc cac gag aaa ttg ttg tta act aaa tgg agt ttc gac gga	336		
Arg His Phe His Glu Lys Leu Leu Thr Lys Trp Ser Phe Asp Gly			
100	105	110	
aat gcc ccc gat gtg aag gac aga gcc gtt ttg aca gat ttc gaa tcg	384		
Asn Ala Pro Asp Val Lys Asp Arg Ala Val Leu Thr Asp Phe Glu Ser			
115	120	125	
att ctt att gaa ttc cac aaa ttg aaa cca gaa tat caa gaa gtc atc	432		
Ile Leu Ile Glu Phe His Lys Leu Lys Pro Glu Tyr Gln Glu Val Ile			
130	135	140	
aag gag atc acc gag aaa atg ggt aat ggt atg gcc gac tac atc tta	480		
Lys Glu Ile Thr Glu Lys Met Gly Asn Gly Met Ala Asp Tyr Ile Leu			
145	150	155	160
gat gaa aat tac aac ttg aat ggg ttg caa acc gtc cac gac tac gac	528		
Asp Glu Asn Tyr Asn Leu Asn Gly Leu Gln Thr Val His Asp Tyr Asp			
165	170	175	
gtg tac tgt cac tac gta gct ggt ttg gtc ggt gat ggt ttg acc cgt	576		
Val Tyr Cys His Tyr Val Ala Gly Leu Val Gly Asp Gly Leu Thr Arg			
180	185	190	
ttg att gtc att gcc aag ttt gcc aac gaa tct ttg tat tct aat gag	624		
Leu Ile Val Ile Ala Lys Phe Ala Asn Glu Ser Leu Tyr Ser Asn Glu			
195	200	205	
caa ttg tat gaa agc atg ggt ctt ttc cta caa aaa acc aac atc atc	672		
Gln Leu Tyr Glu Ser Met Gly Leu Phe Leu Gln Lys Thr Asn Ile Ile			
210	215	220	
aga gat tac aat gaa gat ttg gtc gat ggt aga tcc ttc tgg ccc aag	720		
Arg Asp Tyr Asn Glu Asp Leu Val Asp Gly Arg Ser Phe Trp Pro Lys			
225	230	235	240
gaa atc tgg tca caa tac gct cct cag ttg aag gac ttc atg aaa cct	768		
Glu Ile Trp Ser Gln Tyr Ala Pro Gln Leu Lys Asp Phe Met Lys Pro			
245	250	255	
gaa aac gaa caa ctg ggg ttg gac tgt ata aac cac ctc gtc tta aac	816		

Glu Asn Glu Gln Leu Gly Leu Asp Cys Ile Asn His Leu Val Leu Asn		
260	265	270
gca ttg agt cat gtt atc gat gtg ttg act tat ttg gcc ggt atc cac 864		
Ala Leu Ser His Val Ile Asp Val Leu Thr Tyr Leu Ala Gly Ile His		
275	280	285
gag caa tcc act ttc caa ttt tgt gcc att ccc caa gtt atg gcc att 912		
Glu Gln Ser Thr Phe Gln Phe Cys Ala Ile Pro Gln Val Met Ala Ile		
290	295	300
gca acc ttg gct ttg gta ttc aac aac cgt gaa gtg cta cat ggc aat 960		
Ala Thr Leu Ala Leu Val Phe Asn Asn Arg Glu Val Leu His Gly Asn		
305	310	315
gtt aag att cgt aag ggt act acc tgc tat tta att ttg aaa tca agg 1008		
Val Lys Ile Arg Lys Gly Thr Thr Cys Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Arg		
325	330	335
act ttg cgt ggc tgt gtc gag att ttt gac tat tac tta cgt gat atc 1056		
Thr Leu Arg Gly Cys Val Glu Ile Phe Asp Tyr Tyr Leu Arg Asp Ile		
340	345	350
aaa tct aaa ttg gct gtg caa gat cca aat ttc tta aaa ttg aac att 1104		
Lys Ser Lys Leu Ala Val Gln Asp Pro Asn Phe Leu Lys Leu Asn Ile		
355	360	365
caa atc tcc aag atc gaa cag ttt atg gaa atg tac cag gat aaa 1152		
Gln Ile Ser Lys Ile Glu Gln Phe Met Glu Glu Met Tyr Gln Asp Lys		
370	375	380
tta cct cct aac gtg aag cca aat gaa act cca att ttc ttg aaa gtt 1200		
Leu Pro Pro Asn Val Lys Pro Asn Glu Thr Pro Ile Phe Leu Lys Val		
385	390	395
aaa gaa aga tcc aga tac gat gaa ttg gtt cca acc caa caa gaa 1248		
Lys Glu Arg Ser Arg Tyr Asp Asp Glu Leu Val Pro Thr Gln Gln Glu		
405	410	415
gaa gag tac aag ttc aat atg gtt tta tct atc atc ttg tcc gtt ctt 1296		
Glu Glu Tyr Lys Phe Asn Met Val Leu Ser Ile Ile Leu Ser Val Leu		
420	425	430
ctt ggg ttt tat tat ata tac act tta cac aga gcg tga 1335		
Leu Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Thr Leu His Arg Ala		
435	440	445

<210> 30
<211> 444
<212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 30
Met Gly Lys Leu Leu Gln Leu Ala Leu His Pro Val Glu Met Lys Ala
1 5 10 15

Ala Leu Lys Leu Lys Phe Cys Arg Thr Pro Leu Phe Ser Ile Tyr Asp
 20 25 30

Gln Ser Thr Ser Pro Tyr Leu Leu His Cys Phe Glu Leu Leu Asn Leu
 35 40 45

Thr Ser Arg Ser Phe Ala Ala Val Ile Arg Glu Leu His Pro Glu Leu
 50 55 60

Arg Asn Cys Val Thr Leu Phe Tyr Leu Ile Leu Arg Ala Leu Asp Thr
 65 70 75 80

Ile Glu Asp Asp Met Ser Ile Glu His Asp Leu Lys Ile Asp Leu Leu
 85 90 95

Arg His Phe His Glu Lys Leu Leu Leu Thr Lys Trp Ser Phe Asp Gly
 100 105 110

Asn Ala Pro Asp Val Lys Asp Arg Ala Val Leu Thr Asp Phe Glu Ser
 115 120 125

Ile Leu Ile Glu Phe His Lys Leu Lys Pro Glu Tyr Gln Glu Val Ile
 130 135 140

Lys Glu Ile Thr Glu Lys Met Gly Asn Gly Met Ala Asp Tyr Ile Leu
 145 150 155 160

Asp Glu Asn Tyr Asn Leu Asn Gly Leu Gln Thr Val His Asp Tyr Asp
 165 170 175

Val Tyr Cys His Tyr Val Ala Gly Leu Val Gly Asp Gly Leu Thr Arg
 180 185 190

Leu Ile Val Ile Ala Lys Phe Ala Asn Glu Ser Leu Tyr Ser Asn Glu
 195 200 205

Gln Leu Tyr Glu Ser Met Gly Leu Phe Leu Gln Lys Thr Asn Ile Ile
 210 215 220

Arg Asp Tyr Asn Glu Asp Leu Val Asp Gly Arg Ser Phe Trp Pro Lys
 225 230 235 240

Glu Ile Trp Ser Gln Tyr Ala Pro Gln Leu Lys Asp Phe Met Lys Pro
 245 250 255

Glu Asn Glu Gln Leu Gly Leu Asp Cys Ile Asn His Leu Val Leu Asn
 260 265 270

Ala Leu Ser His Val Ile Asp Val Leu Thr Tyr Leu Ala Gly Ile His
 275 280 285

Glu Gln Ser Thr Phe Gln Phe Cys Ala Ile Pro Gln Val Met Ala Ile
 290 295 300

Ala Thr Leu Ala Leu Val Phe Asn Asn Arg Glu Val Leu His Gly Asn
 305 310 315 320

Val Lys Ile Arg Lys Gly Thr Thr Cys Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Arg
 325 330 335

Thr Leu Arg Gly Cys Val Glu Ile Phe Asp Tyr Tyr Leu Arg Asp Ile
 340 345 350

Lys Ser Lys Leu Ala Val Gln Asp Pro Asn Phe Leu Lys Leu Asn Ile
 355 360 365

Gln Ile Ser Lys Ile Glu Gln Phe Met Glu Glu Met Tyr Gln Asp Lys
 370 375 380

Leu Pro Pro Asn Val Lys Pro Asn Glu Thr Pro Ile Phe Leu Lys Val
 385 390 395 400

Lys Glu Arg Ser Arg Tyr Asp Asp Glu Leu Val Pro Thr Gln Gln Glu
 405 410 415

Glu Glu Tyr Lys Phe Asn Met Val Leu Ser Ile Ile Leu Ser Val Leu
 420 425 430

Leu Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Thr Leu His Arg Ala
 435 440

<210> 31

<211> 1929

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1929)

<400> 31

atg gac aag aag aag gat cta ctg gag aac gaa caa ttt ctc cgc atc	48
Met Asp Lys Lys Asp Leu Leu Glu Asn Gln Phe Leu Arg Ile	
1 5 10 15	

caa aag ctc aac gct gcc gat gcg ggc aaa aga caa tct ata aca gtg	96
Gln Lys Leu Asn Ala Ala Asp Ala Gly Lys Arg Gln Ser Ile Thr Val	
20 25 30	

gac gac gag ggc gaa cta tat ggg tta gac acc tcc ggc aac tca cca	144
Asp Asp Glu Gly Glu Leu Tyr Gly Leu Asp Thr Ser Gly Asn Ser Pro	
35 40 45	

gcc aat gaa cac aca gct acc aca att aca cag aat cac agc gtg gtg	192
Ala Asn Glu His Thr Ala Thr Thr Ile Thr Gln Asn His Ser Val Val	
50 55 60	

gcc tca aac gga gac gtc gca ttc atc cca gga act gct acc gaa ggc	240
Ala Ser Asn Gly Asp Val Ala Phe Ile Pro Gly Thr Ala Thr Glu Gly	
65 70 75 80	

aat aca gag att gta act gaa gaa gtg att gag acc gat gat aac atg	288
Asn Thr Glu Ile Val Thr Glu Val Ile Glu Thr Asp Asn Met	

85

90

95

ttc aag acc cat gtg aag act tta agc tcc aaa gag aag gca cg ^g tat	336		
Phe Lys Thr His Val Lys Thr Leu Ser Ser Lys Glu Lys Ala Arg Tyr			
100	105	110	
agg caa ggg tcc tct aac ttt ata tcg tat ttc gat gat atg tca ttt	384		
Arg Gln Gly Ser Ser Asn Phe Ile Ser Tyr Phe Asp Asp Met Ser Phe			
115	120	125	
gaa cac agg ccc agt ata tta gat ggg tca gtt aac gag ccc ttc aag	432		
Glu His Arg Pro Ser Ile Leu Asp Gly Ser Val Asn Glu Pro Phe Lys			
130	135	140	
acc aaa ttc gtg gga cct act tta gaa aag gag atc aga aga agg gag	480		
Thr Lys Phe Val Gly Pro Thr Leu Glu Lys Glu Ile Arg Arg Arg Glu			
145	150	155	160
aaa gag cta atg gcc atg cgc aaa aat tta cac cac cgc aag tcc tcc	528		
Lys Glu Leu Met Ala Met Arg Lys Asn Leu His His Arg Lys Ser Ser			
165	170	175	
cca gat gct gtc gac tca gta ggg aaa aat gat ggc gcc gcc cca act	576		
Pro Asp Ala Val Asp Ser Val Gly Lys Asn Asp Gly Ala Ala Pro Thr			
180	185	190	
act gtt cca act gcc gcc acc tca gaa acg gtg gtc acc gtt gaa acc	624		
Thr Val Pro Thr Ala Ala Thr Ser Glu Thr Val Val Thr Val Glu Thr			
195	200	205	
acc ata att tca tcc aat ttc tcc ggg ttg tac gtg gcg ttt tgg atg	672		
Thr Ile Ile Ser Ser Asn Phe Ser Gly Leu Tyr Val Ala Phe Trp Met			
210	215	220	
gct att gca ttt ggt gct gtc aag gct tta ata gac tat tat tac cag	720		
Ala Ile Ala Phe Gly Ala Val Lys Ala Leu Ile Asp Tyr Tyr Tyr Gln			
225	230	235	240
cat aat ggt agc ttc aag gat tcg gag atc ttg aaa ttt atg act acg	768		
His Asn Gly Ser Phe Lys Asp Ser Glu Ile Leu Lys Phe Met Thr Thr			
245	250	255	
aat ttg ttc act gtg gca tcc gta gat ctt ttg atg tat ttg agc act	816		
Asn Leu Phe Thr Val Ala Ser Val Asp Leu Leu Met Tyr Leu Ser Thr			
260	265	270	
tat ttt gtc gtt gga ata caa tac tta tgc aag tgg ggg gtc ttg aaa	864		
Tyr Phe Val Val Gly Ile Gln Tyr Leu Cys Lys Trp Gly Val Leu Lys			
275	280	285	
tgg ggc act acc ggc tgg atc ttc acc tca att tac gag ttt ttg ttt	912		
Trp Gly Thr Thr Gly Trp Ile Phe Thr Ser Ile Tyr Glu Phe Leu Phe			
290	295	300	
gtt atc ttc tac atg tat tta aca gaa aac atc cta aaa cta cac tgg	960		
Val Ile Phe Tyr Met Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Leu Lys Leu His Trp			
305	310	315	320

ctg tcc aag atc ttc ctt ttt ttg cat tct tta gtt tta ttg atg aaa Leu Ser Lys Ile Phe Leu Phe Leu His Ser Leu Val Leu Leu Met Lys 325 330 335	1008
atg cat tct ttc gcc ttc tac aat ggc tat cta tgg ggt ata aag gaa Met His Ser Phe Ala Phe Tyr Asn Gly Tyr Leu Trp Gly Ile Lys Glu 340 345 350	1056
gaa cta caa ttt tcc aaa agc gct ctt gcc aaa tac aag gat tct ata Glu Leu Gln Phe Ser Lys Ser Ala Leu Ala Lys Tyr Lys Asp Ser Ile 355 360 365	1104
aat gat cca aaa gtt att ggt gct ctt gag aaa agc tgt gag ttt tgt Asn Asp Pro Lys Val Ile Gly Ala Leu Glu Lys Ser Cys Glu Phe Cys 370 375 380	1152
agt ttt gaa ttg agc tct cag tct tta agc gac caa act caa aaa ttc Ser Phe Glu Leu Ser Ser Gln Ser Leu Ser Asp Gln Thr Gln Lys Phe 385 390 395 400	1200
ccc aac aat atc agt gca aaa agc ttt ttt ttg ttc acc atg ttt cca Pro Asn Asn Ile Ser Ala Lys Ser Phe Phe Trp Phe Thr Met Phe Pro 405 410 415	1248
acc cta att tac caa att gaa tat cca aga act aag gaa atc aga tgg Thr Leu Ile Tyr Gln Ile Glu Tyr Pro Arg Thr Lys Glu Ile Arg Trp 420 425 430	1296
agc tac gta tta gaa aag atc tgc gcc atc ttc ggt acc att ttc tta Ser Tyr Val Leu Glu Lys Ile Cys Ala Ile Phe Gly Thr Ile Phe Leu 435 440 445	1344
atg atg ata gat gct caa atc ttg atg tat cct gta gca atg aga gca Met Met Ile Asp Ala Gln Ile Leu Met Tyr Pro Val Ala Met Arg Ala 450 455 460	1392
ttg gct gtg cgc aat tct gaa tgg act ggt ata ttg gat aga tta ttg Leu Ala Val Arg Asn Ser Glu Trp Thr Gly Ile Leu Asp Arg Leu Leu 465 470 475 480	1440
aaa tgg gtt gga ttg ctc gtt gat atc gtc cca ggg ttt atc gtg atg Lys Trp Val Gly Leu Leu Val Asp Ile Val Pro Gly Phe Ile Val Met 485 490 495	1488
tac atc ttg gac ttc tat ttg att tgg gat gcc att ttg aac tgt gtg Tyr Ile Leu Asp Phe Tyr Leu Ile Trp Asp Ala Ile Leu Asn Cys Val 500 505 510	1536
gct gaa ttg aca aga ttt ggc gac aga tat ttc tac ggt gac tgg tgg Ala Glu Leu Thr Arg Phe Gly Asp Arg Tyr Phe Tyr Gly Asp Trp Trp 515 520 525	1584
aat tgt gtt agt tgg gca gac ttc agt aga att tgg aac atc cca gtg Asn Cys Val Ser Trp Ala Asp Phe Ser Arg Ile Trp Asn Ile Pro Val 530 535 540	1632

cat aag ttt ttg tta aga cat gtt tac cat agt tca atg agt tca ttc		1680
His Lys Phe Leu Leu Arg His Val Tyr His Ser Ser Met Ser Ser Phe		
545	550	555
		560
aaa ttg aac aag agt caa gca act ttg atg acc ttt ttc tta agt tcc		1728
Lys Leu Asn Lys Ser Gln Ala Thr Leu Met Thr Phe Phe Leu Ser Ser		
565	570	575
gtc gtt cat gaa tta gca atg tac gtt atc ttc aag aaa ttg agg ttt		1776
Val Val His Glu Leu Ala Met Tyr Val Ile Phe Lys Lys Leu Arg Phe		
580	585	590
tac ttg ttc ttc caa atg ctg caa atg cca tta gta gct tta aca		1824
Tyr Leu Phe Phe Gln Met Leu Gln Met Pro Leu Val Ala Leu Thr		
595	600	605
aat act aaa ttc atg agg aac aga acc ata atc gga aat gtt att ttc		1872
Asn Thr Lys Phe Met Arg Asn Arg Thr Ile Ile Gly Asn Val Ile Phe		
610	615	620
tgg ctc ggt atc tgc atg gga cca agt gtc atg tgt acg ttg tac ttg		1920
Trp Leu Gly Ile Cys Met Gly Pro Ser Val Met Cys Thr Leu Tyr Leu		
625	630	635
		640
aca ttc taa		1929
Thr Phe		

<210> 32

<211> 642

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 32

Met Asp Lys Lys Asp Leu Leu Glu Asn Glu Gln Phe Leu Arg Ile		
1	5	10
		15

Gln Lys Leu Asn Ala Ala Asp Ala Gly Lys Arg Gln Ser Ile Thr Val		
20	25	30

Asp Asp Glu Gly Glu Leu Tyr Gly Leu Asp Thr Ser Gly Asn Ser Pro		
35	40	45

Ala Asn Glu His Thr Ala Thr Thr Ile Thr Gln Asn His Ser Val Val		
50	55	60

Ala Ser Asn Gly Asp Val Ala Phe Ile Pro Gly Thr Ala Thr Glu Gly		
65	70	75
		80

Asn Thr Glu Ile Val Thr Glu Glu Val Ile Glu Thr Asp Asp Asn Met		
85	90	95

Phe Lys Thr His Val Lys Thr Leu Ser Ser Lys Glu Lys Ala Arg Tyr		
100	105	110

Arg Gln Gly Ser Ser Asn Phe Ile Ser Tyr Phe Asp Asp Met Ser Phe		
115	120	125

Glu His Arg Pro Ser Ile Leu Asp Gly Ser Val Asn Glu Pro Phe Lys
130 135 140

Thr Lys Phe Val Gly Pro Thr Leu Glu Lys Glu Ile Arg Arg Arg Glu
145 150 155 160

Lys Glu Leu Met Ala Met Arg Lys Asn Leu His His Arg Lys Ser Ser
165 170 175

Pro Asp Ala Val Asp Ser Val Gly Lys Asn Asp Gly Ala Ala Pro Thr
180 185 190

Thr Val Pro Thr Ala Ala Thr Ser Glu Thr Val Val Thr Val Glu Thr
195 200 205

Thr Ile Ile Ser Ser Asn Phe Ser Gly Leu Tyr Val Ala Phe Trp Met.
210 215 220

Ala Ile Ala Phe Gly Ala Val Lys Ala Leu Ile Asp Tyr Tyr Tyr Gln
225 230 235 240

His Asn Gly Ser Phe Lys Asp Ser Glu Ile Leu Lys Phe Met Thr Thr
245 250 255

Asn Leu Phe Thr Val Ala Ser Val Asp Leu Leu Met Tyr Leu Ser Thr
260 265 270

Tyr Phe Val Val Gly Ile Gln Tyr Leu Cys Lys Trp Gly Val Leu Lys
275 280 285

Trp Gly Thr Thr Gly Trp Ile Phe Thr Ser Ile Tyr Glu Phe Leu Phe
290 295 300

Val Ile Phe Tyr Met Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Leu Lys Leu His Trp
305 310 315 320

Leu Ser Lys Ile Phe Leu Phe Leu His Ser Leu Val Leu Leu Met Lys
325 330 335

Met His Ser Phe Ala Phe Tyr Asn Gly Tyr Leu Trp Gly Ile Lys Glu
340 345 350

Glu Leu Gln Phe Ser Lys Ser Ala Leu Ala Lys Tyr Lys Asp Ser Ile
355 360 365

Asn Asp Pro Lys Val Ile Gly Ala Leu Glu Lys Ser Cys Glu Phe Cys
370 375 380

Ser Phe Glu Leu Ser Ser Gln Ser Leu Ser Asp Gln Thr Gln Lys Phe
385 390 395 400

Pro Asn Asn Ile Ser Ala Lys Ser Phe Phe Trp Phe Thr Met Phe Pro
405 410 415

Thr Leu Ile Tyr Gln Ile Glu Tyr Pro Arg Thr Lys Glu Ile Arg Trp
420 425 430

Ser Tyr Val Leu Glu Lys Ile Cys Ala Ile Phe Gly Thr Ile Phe Leu
 435 440 445

Met Met Ile Asp Ala Gln Ile Leu Met Tyr Pro Val Ala Met Arg Ala
 450 455 460

Leu Ala Val Arg Asn Ser Glu Trp Thr Gly Ile Leu Asp Arg Leu Leu
 465 470 475 480

Lys Trp Val Gly Leu Leu Val Asp Ile Val Pro Gly Phe Ile Val Met
 485 490 495

Tyr Ile Leu Asp Phe Tyr Leu Ile Trp Asp Ala Ile Leu Asn Cys Val
 500 505 510

Ala Glu Leu Thr Arg Phe Gly Asp Arg Tyr Phe Tyr Gly Asp Trp Trp
 515 520 525

Asn Cys Val Ser Trp Ala Asp Phe Ser Arg Ile Trp Asn Ile Pro Val
 530 535 540

His Lys Phe Leu Leu Arg His Val Tyr His Ser Ser Met Ser Ser Phe
 545 550 555 560

Lys Leu Asn Lys Ser Gln Ala Thr Leu Met Thr Phe Phe Leu Ser Ser
 565 570 575

Val Val His Glu Leu Ala Met Tyr Val Ile Phe Lys Lys Leu Arg Phe
 580 585 590

Tyr Leu Phe Phe Phe Gln Met Leu Gln Met Pro Leu Val Ala Leu Thr
 595 600 605

Asn Thr Lys Phe Met Arg Asn Arg Thr Ile Ile Gly Asn Val Ile Phe
 610 615 620

Trp Leu Gly Ile Cys Met Gly Pro Ser Val Met Cys Thr Leu Tyr Leu
 625 630 635 640

Thr Phe

<210> 33
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(60)

<400> 33
 atgtcgaaag ctacatataa ggaacgtgct gcatctcatc ccagctgaag cttcgtaacgc 60

<210> 34
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz:Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(62)

<400> 34
ttagtttgc tggccgcata ttctcaaata tgcttcccag gcataggcca ctagtgatc 60
tg 62

<210> 35
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(60)

<400> 35
gaatactcag gtatcgtaag atgcaagagt tcgaatctct ccagctgaag cttcgtacgc 60

<210> 36
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(62)

<400> 36
tctaccctat gaacatattc cattttgtaa ttccgtgtcg gcataggcca ctagtgatc 60
tg 62

<210> 37
<211> 60
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(60)

<400> 37

atgacagagc agaaaaggccct agtaaagcgt attacaaatg ccagctgaag ctgcgtacgc 60

<210> 38

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(62)

<400> 38

ctacataaga acacctttgg tggagggAAC atcgTTGGTA gcataggCCA ctagtggATC 60

tg

62

<210> 39

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(60)

<400> 39

atgagtAAA cagaATTGAG AAAAAGACAG GCCCAATTCA ccagctgaag ctgcgtacgc 60

<210> 40

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(62)

<400> 40

ttattgagtt gcttcttggg aagtttggga gggggtttcg gcataaggcca ctagtggatc 60

tg

62

<210> 41

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(60)

<400> 41

atgagttctg tcgcagaaaa tataatacaa catgccactc ccagctgaag cttcgtacgc 60

<210> 42

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(62)

<400> 42

ttattcgaag acttctccag taattgggtc tctcttttgc gcataaggcca ctagtggatc 60

tg

62

<210> 43

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(33)

<400> 43

ctgcggccgc aacatgacca ccaatacggt ccc

33

<210> 44
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(27)

<400> 44
ttctcgagtc ttttagttatg cttgctc

27

<210> 45
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(33)

<400> 45
ctgcggccgc aagatggacc tggttctcag tgc

33

<210> 46
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(29)

<400> 46
ttctcgagct acttattctt tgtaaaactc

29

<210> 47
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(32)

<400> 47
ctgcggccgc aagatggagc ccgcccgtgtc gc

32

<210> 48
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(28)

<400> 48
aactcgagtc agtgccttgc cgccttgc

28

<210> 49
<211> 1833
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1833)

<400> 49
atg acg gag act aag gat ttg ttg caa gac gaa gag ttt ctt aag atc 48
Met Thr Glu Thr Lys Asp Leu Leu Gln Asp Glu Glu Phe Leu Lys Ile
1 5 10 15

cgc aga ctc aat tcc gca gaa gcc aac aaa cgg cat tcg gtc acg tac 96
Arg Arg Leu Asn Ser Ala Glu Ala Asn Lys Arg His Ser Val Thr Tyr
20 25 30

gat aac gtg atc ctg cca cag gag tcc atg gag gtt tcg cca cgg tcg 144
Asp Asn Val Ile Leu Pro Gln Glu Ser Met Glu Val Ser Pro Arg Ser
35 40 45

tct acc acg tcg ctg gtg gag cca gtg gag tcg act gaa gga gtg gag 192
Ser Thr Ser Leu Val Glu Pro Val Glu Ser Thr Glu Gly Val Glu
50 55 60

tcg act gag gcg gaa cgt gtg gca ggg aag cag gag cag gag gag 240
Ser Thr Glu Ala Glu Arg Val Ala Gly Lys Gln Glu Gln Glu Glu
65 70 75 80

tac cct gtg gac gcc cac atg caa aag tac ctt tca cac ctg aag agc 288
Tyr Pro Val Asp Ala His Met Gln Lys Tyr Leu Ser His Leu Lys Ser
85 90 95

aag tct cgg tcg agg ttc cac cga aag gat gct agc aag tat gtg tcg	336
Lys Ser Arg Ser Arg Phe His Arg Lys Asp Ala Ser Lys Tyr Val Ser	
100 105 110	
ttt ttt ggg gac gtg agt ttt gat cct cgc ccc acg ctc ctg gac agc	384
Phe Phe Gly Asp Val Ser Phe Asp Pro Arg Pro Thr Leu Leu Asp Ser	
115 120 125	
gcc atc aac gtg ccc ttc cag acg act ttc aaa ggt ccg gtg ctg gag	432
Ala Ile Asn Val Pro Phe Gln Thr Thr Phe Lys Gly Pro Val Leu Glu	
130 135 140	
aaa cag ctc aaa aat tta cag ttg aca aag acc aac aag gcc acg	480
Lys Gln Leu Lys Asn Leu Gln Leu Thr Lys Thr Lys Thr Lys Ala Thr	
145 150 155 160	
gtg aag act acg gtg aag act acg gag aaa acg gac aag gca gat gcc	528
Val Lys Thr Thr Val Lys Thr Glu Lys Thr Asp Lys Ala Asp Ala	
165 170 175	
ccc cca gga gaa aaa ctg gag tcg aac ttt tca ggg atc tac gtg ttc	576
Pro Pro Gly Glu Lys Leu Glu Ser Asn Phe Ser Gly Ile Tyr Val Phe	
180 185 190	
gca tgg atg ttc ttg ggc tgg ata gcc atc agg tgc tgc aca gat tac	624
Ala Trp Met Phe Leu Gly Trp Ile Ala Ile Arg Cys Cys Thr Asp Tyr	
195 200 205	
tat gcg tcg tac ggc agt gca tgg aat aag ctg gaa atc gtg cag tac	672
Tyr Ala Ser Tyr Gly Ser Ala Trp Asn Lys Leu Glu Ile Val Gln Tyr	
210 215 220	
atg aca acg gac ttg ttc acg atc gca atg ttg gac ttg gca atg ttc	720
Met Thr Asp Leu Phe Thr Ile Ala Met Leu Asp Leu Ala Met Phe	
225 230 235 240	
ctg tgc act ttc ttc gtg gtt ttc gtg cac tgg ctg gtg aaa aag cgg	768
Leu Cys Thr Phe Phe Val Val Phe Val His Trp Leu Val Lys Lys Arg	
245 250 255	
atc atc aac tgg aag tgg act ggg ttc gtt gca gtg agc atc ttc gag	816
Ile Ile Asn Trp Lys Trp Thr Gly Phe Val Ala Val Ser Ile Phe Glu	
260 265 270	
ttg gct atc ccc gtg acg ttc ccc att tac gtc tac tac ttt gat	864
Leu Ala Phe Ile Pro Val Thr Phe Pro Ile Tyr Val Tyr Tyr Phe Asp	
275 280 285	
ttc aac tgg gtc acg aga atc ttc ctg ttc ctg cac tcc gtg gtg ttt	912
Phe Asn Trp Val Thr Arg Ile Phe Leu Phe Leu His Ser Val Val Phe	
290 295 300	
gtt atg aag agc cac tcg ttt gcc ttt tac aac ggg tat ctt tgg gac	960
Val Met Lys Ser His Ser Phe Ala Phe Tyr Asn Gly Tyr Leu Trp Asp	
305 310 315 320	

ata aag cag gaa ctc gag tac tct tcc aaa cag ttg caa aaa tac aag Ile Lys Gln Glu Leu Glu Tyr Ser Ser Lys Gln Leu Gln Lys Tyr Lys 325 330 335	1008
gaa tct ttg tcc cca gag acc cgc gag att ctg caa aaa agt tgc gac Glu Ser Leu Ser Pro Glu Thr Arg Glu Ile Leu Gln Lys Ser Cys Asp 340 345 350	1056
ttt tgc ctt ttc gaa ttg aac tac cag acc aag gat aac gac ttc ccc Phe Cys Leu Phe Glu Leu Asn Tyr Gln Thr Lys Asp Asn Asp Phe Pro 355 360 365	1104
aac aac atc agt tgc agc aat ttc ttc atg ttc tgt ttg ttc ccc gtc Asn Asn Ile Ser Cys Ser Asn Phe Phe Met Phe Cys Leu Phe Pro Val 370 375 380	1152
ctc gtg tac cag atc aac tac cca aga acg tcg cgc atc aga tgg agg Leu Val Tyr Gln Ile Asn Tyr Pro Arg Thr Ser Arg Ile Arg Trp Arg 385 390 395 400	1200
tat gtg ttg gag aag gtg tgc gcc atc att ggc acc atc ttc ctc atg Tyr Val Leu Glu Lys Val Cys Ala Ile Ile Gly Thr Ile Phe Leu Met 405 410 415	1248
atg gtc acg gca cag ttc ttc atg cac ccg gtg gcc atg cgc tgt atc Met Val Thr Ala Gln Phe Met His Pro Val Ala Met Arg Cys Ile 420 425 430	1296
cag ttc cac aac acg ccc acc ttc ggc ggc tgg atc ccc gcc acg caa Gln Phe His Asn Thr Pro Thr Phe Gly Gly Trp Ile Pro Ala Thr Gln 435 440 445	1344
gag tgg ttc cac ctg ctc ttc gac atg att ccg ggc ttc act gtt ctg Glu Trp Phe His Leu Leu Phe Asp Met Ile Pro Gly Phe Thr Val Leu 450 455 460	1392
tac atg ctc acg ttt tac atg ata tgg gac gct tta ttg aat tgc gtg Tyr Met Leu Thr Phe Tyr Met Ile Trp Asp Ala Leu Leu Asn Cys Val 465 470 475 480	1440
gcg gag ttg acc agg ttt gcg gac aga tat ttc tac ggc gac tgg tgg Ala Glu Leu Thr Arg Phe Ala Asp Arg Tyr Phe Tyr Gly Asp Trp Trp 485 490 495	1488
aat tgc gtt tcg ttt gaa gag ttt agc aga atc tgg aac gtc ccc gtt Asn Cys Val Ser Phe Glu Glu Phe Ser Arg Ile Trp Asn Val Pro Val 500 505 510	1536
cac aaa ttt tta cta aga cac gtg tac cac agc tcc atg ggc gca ttg His Lys Phe Leu Leu Arg His Val Tyr His Ser Ser Met Gly Ala Leu 515 520 525	1584
cat ttg agc aag agc caa gct aca tta ttt act ttt ttc ttg agt gcc His Leu Ser Lys Ser Gln Ala Thr Leu Phe Thr Phe Phe Leu Ser Ala 530 535 540	1632
gtg ttc cac gaa atg gcc atg ttc gcc att ttc aga agg gtt aga gga	1680

Val Phe His Glu Met Ala Met Phe Ala Ile Phe Arg Arg Val Arg Gly				
545	550	555	560	
tat ctg ttc atg ttc caa ctg tcg cag ttt gtg tgg act gct ttg agc				1728
Tyr Leu Phe Met Phe Gln Leu Ser Gln Phe Val Trp Thr Ala Leu Ser				
565	570	575		
aac acc aag ttt cta cgg gca aga ccg cag ttg tcc aac gtt gtc ttt				1776
Asn Thr Lys Phe Leu Arg Ala Arg Pro Gln Leu Ser Asn Val Val Phe				
580	585	590		
tcg ttt ggt gtc tgt tca ggg ccc agt atc att atg acg ttg tac ctg				1824
Ser Phe Gly Val Cys Ser Gly Pro Ser Ile Ile Met Thr Leu Tyr Leu				
595	600	605		
acc tta tga				1833
Thr Leu				
610				
<210> 50				
<211> 610				
<212> PRT				
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
<400> 50				
Met Thr Glu Thr Lys Asp Leu Leu Gln Asp Glu Glu Phe Leu Lys Ile				
1	5	10	15	
Arg Arg Leu Asn Ser Ala Glu Ala Asn Lys Arg His Ser Val Thr Tyr				
20	25	30		
Asp Asn Val Ile Leu Pro Gln Glu Ser Met Glu Val Ser Pro Arg Ser				
35	40	45		
Ser Thr Thr Ser Leu Val Glu Pro Val Glu Ser Thr Glu Gly Val Glu				
50	55	60		
Ser Thr Glu Ala Glu Arg Val Ala Gly Lys Gln Glu Gln Glu Glu Glu				
65	70	75	80	
Tyr Pro Val Asp Ala His Met Gln Lys Tyr Leu Ser His Leu Lys Ser				
85	90	95		
Lys Ser Arg Ser Arg Phe His Arg Lys Asp Ala Ser Lys Tyr Val Ser				
100	105	110		
Phe Phe Gly Asp Val Ser Phe Asp Pro Arg Pro Thr Leu Leu Asp Ser				
115	120	125		
Ala Ile Asn Val Pro Phe Gln Thr Thr Phe Lys Gly Pro Val Leu Glu				
130	135	140		
Lys Gln Leu Lys Asn Leu Gln Leu Thr Lys Thr Lys Thr Lys Ala Thr				
145	150	155	160	
Val Lys Thr Thr Val Lys Thr Thr Glu Lys Thr Asp Lys Ala Asp Ala				

165

170

175

Pro Pro Gly Glu Lys Leu Glu Ser Asn Phe Ser Gly Ile Tyr Val Phe
180 185 190

Ala Trp Met Phe Leu Gly Trp Ile Ala Ile Arg Cys Cys Thr Asp Tyr
195 200 205

Tyr Ala Ser Tyr Gly Ser Ala Trp Asn Lys Leu Glu Ile Val Gln Tyr
210 215 220

Met Thr Thr Asp Leu Phe Thr Ile Ala Met Leu Asp Leu Ala Met Phe
225 230 235 240

Leu Cys Thr Phe Phe Val Val Phe Val His Trp Leu Val Lys Lys Arg
245 250 255

Ile Ile Asn Trp Lys Trp Thr Gly Phe Val Ala Val Ser Ile Phe Glu
260 265 270

Leu Ala Phe Ile Pro Val Thr Phe Pro Ile Tyr Val Tyr Tyr Phe Asp
275 280 285

Phe Asn Trp Val Thr Arg Ile Phe Leu Phe Leu His Ser Val Val Phe
290 295 300

Val Met Lys Ser His Ser Phe Ala Phe Tyr Asn Gly Tyr Leu Trp Asp
305 310 315 320

Ile Lys Gln Glu Leu Glu Tyr Ser Ser Lys Gln Leu Gln Lys Tyr Lys
325 330 335

Glu Ser Leu Ser Pro Glu Thr Arg Glu Ile Leu Gln Lys Ser Cys Asp
340 345 350

Phe Cys Leu Phe Glu Leu Asn Tyr Gln Thr Lys Asp Asn Asp Phe Pro
355 360 365

Asn Asn Ile Ser Cys Ser Asn Phe Phe Met Phe Cys Leu Phe Pro Val
370 375 380

Leu Val Tyr Gln Ile Asn Tyr Pro Arg Thr Ser Arg Ile Arg Trp Arg
385 390 395 400

Tyr Val Leu Glu Lys Val Cys Ala Ile Ile Gly Thr Ile Phe Leu Met
405 410 415

Met Val Thr Ala Gln Phe Phe Met His Pro Val Ala Met Arg Cys Ile
420 425 430

Gln Phe His Asn Thr Pro Thr Phe Gly Gly Trp Ile Pro Ala Thr Gln
435 440 445

Glu Trp Phe His Leu Leu Phe Asp Met Ile Pro Gly Phe Thr Val Leu
450 455 460

Tyr Met Leu Thr Phe Tyr Met Ile Trp Asp Ala Leu Leu Asn Cys Val

68

465

470

475

480

Ala Glu Leu Thr Arg Phe Ala Asp Arg Tyr Phe Tyr Gly Asp Trp Trp
 485 490 495

Asn Cys Val Ser Phe Glu Glu Phe Ser Arg Ile Trp Asn Val Pro Val
 500 505 510

His Lys Phe Leu Leu Arg His Val Tyr His Ser Ser Met Gly Ala Leu
 515 520 525

His Leu Ser Lys Ser Gln Ala Thr Leu Phe Thr Phe Phe Leu Ser Ala
 530 535 540

Val Phe His Glu Met Ala Met Phe Ala Ile Phe Arg Arg Val Arg Gly
 545 550 555 560

Tyr Leu Phe Met Phe Gln Leu Ser Gln Phe Val Trp Thr Ala Leu Ser
 565 570 575

Asn Thr Lys Phe Leu Arg Ala Arg Pro Gln Leu Ser Asn Val Val Phe
 580 585 590

Ser Phe Gly Val Cys Ser Gly Pro Ser Ile Ile Met Thr Leu Tyr Leu
 595 600 605

Thr Leu
 610

<210> 51
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(33)

<400> 51
ctgcggccgc atcatgtctg ctgttaacgt tgc

33

<210> 52
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(30)

<400> 52
ttctcgagtt aaccaatcaa ctcaccaaac 30

<210> 53
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer
<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(35)

<400> 53
ctgcggccgc aggatgtctg ctaccaagtc aatcg 35

<210> 54
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer
<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(34)

<400> 54
atctcgagct tagatcttt gttctggatt tctc 34

<210> 55
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer
<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(32)

<400> 55
ctgcggccgc accatgaagt ttttcccact cc 32

<210> 56
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(33)

<400> 56
ttctcgagtt agaacaaaaa gtttgcaac aag

33

<210> 57
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(35)

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<400> 57
ctgcggccgc aatatggatt tggtcttaga agtcg

35

<210> 58
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(31)

<400> 58
aactcgagtc agttgttctt cttggatattt g

31

<210> 59
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(34)

<400> 59

ctgcggccgc actatggcaa aggataatag tgag

34

<210> 60

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(32)

<400> 60

ttctcgagct agaaaacata aggaataaaag ac

32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Application No
PCT/EP 03/00592

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/52 C12N15/81 C12N9/90 C12N9/02 C12P33/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>US 5 480 805 A (WOLF FRED R ET AL) 2 January 1996 (1996-01-02)</p> <p>Column 7, lines 5-9 column 3, line 62 -column 4, line 37 ----</p> <p style="text-align: right;">-/--</p>	<p>1-5, 16, 17, 19, 21, 22, 28, 42, 44-48, 50-54, 56-58</p>

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 June 2003

Date of mailing of the international search report

11/07/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stolz, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte ial Application No
PCT/EP 03/00592

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SILVE S. ET AL.: "Emopamil binding Protein, a Mammalian Protein that Binds a Series of Structurally Diverse Neuroprotective Agents, Exhibits delta8-delta7 Sterol Isomerase Activity in Yeast" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 37, 13 September 1996 (1996-09-13), pages 22434-22440, XP002245941 the whole document ---	42,47,57
X	HUSSELSTEIN T. ET AL. : "delta7-Sterol-C5-desaturase: molecular characterization and functional expression of wild-type and mutant alleles" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 39, 1999, pages 891-906, XP002245942 the whole document ---	42,47, 48,57
X	LEES N D ET AL: "Cloning of the late genes in the ergosterol Biosynthetic pathway of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " LIPIDS, CHAMPAIGN, IL, US, vol. 30, no. 3, 1 March 1995 (1995-03-01), pages 221-226, XP002094332 ISSN: 0024-4201 figure 2 ---	42,47, 48,57
X	NISHI S.: "cDNA cloning of the mammalian sterol C5-desaturase and the expression in yeast mutant" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1490, 2000, pages 106-108, XP002245943 cited in the application the whole document ---	42,47, 48,57
X	WO 98 45457 A (MONSANTO CO) 15 October 1998 (1998-10-15) claims 6,16 ---	42,47,48
P,X	WO 02 061072 A (KARUNANANDAA BALASULOJINI ; MONSANTO TECHNOLOGY LLC (US); POST-BEIT) 8 August 2002 (2002-08-08) page 72-73; claim 6 -----	42-48, 53-55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/00592

The International Searching Authority has determined that this international application contains more than one invention or group of inventions, namely:

Invention 1

Claims 1-3 (in part), 4-7, 16-41 (in part)

Methods of producing 7-dehydrocholesterol or its intermediate and secondary products, characterized in that the delta₈-delta₇ isomerase activity is increased

Invention 2

Claims 1-3 (in part), 8-11, 16-41 (in part)

Methods of producing 7-dehydrocholesterol or its intermediate and secondary products, characterized in that the delta₅ desaturase activity is increased

Invention 3

Claims 1-3 (in part), 12-15, 16-41 (in part)

Methods of producing 7-dehydrocholesterol or its intermediate and secondary products, characterized in that the delta₂₄ reductase activity is increased

Inventions 4-6

Claims 42-57, each in part

Nucleic acid constructs and organisms transformed thereby containing one of the three abovementioned enzymes alone or in combination with other enzymes.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/00592

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See continuation sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/EP 03/00592

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5480805	A	02-01-1996	NONE		
WO 9845457	A	15-10-1998	AU	724046 B2	07-09-2000
			AU	5709998 A	30-10-1998
			BR	9714439 A	21-03-2000
			CN	1247569 A	15-03-2000
			EP	0958370 A1	24-11-1999
			WO	9845457 A1	15-10-1998
			US	2002148006 A1	10-10-2002
WO 02061072	A	08-08-2002	WO	02061072 A2	08-08-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int	tales Aktenzeichen
PCT/EP 03/00592	

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7	C12N15/52	C12N15/81	C12N9/90	C12N9/02	C12P33/00
-------	-----------	-----------	----------	----------	-----------

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 480 805 A (WOLF FRED R ET AL) 2. Januar 1996 (1996-01-02) Spalte 7, Zeilen 5-9 Spalte 3, Zeile 62 -Spalte 4, Zeile 37 ----	1-5, 16, 17, 19, 21, 22, 28, 42, 44-48, 50-54, 56-58 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
 - *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
 - *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Aussstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
 - *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
 - *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
 - *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. Juni 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11/07/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stolz, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Aktenzeichen
PCT/EP 03/00592

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SILVE S. ET AL.: "Emopamil binding Protein, a Mammalian Protein that Binds a Series of Structurally Diverse Neuroprotective Agents, Exhibits delta8-delta7 Sterol Isomerase Activity in Yeast" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 271, Nr. 37, 13. September 1996 (1996-09-13), Seiten 22434-22440, XP002245941 das ganze Dokument ---	42,47,57
X	HUSSELSTEIN T. ET AL. : "delta7-Sterol-C5-desaturase: molecular characterization and functional expression of wild-type and mutant alleles" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 39, 1999, Seiten 891-906, XP002245942 das ganze Dokument ---	42,47, 48,57
X	LEES N D ET AL: "Cloning of the late genes in the ergosterol Biosynthetic pathway of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " LIPIDS, CHAMPAIGN, IL, US, Bd. 30, Nr. 3, 1. März 1995 (1995-03-01), Seiten 221-226, XP002094332 ISSN: 0024-4201 Abbildung 2 ---	42,47, 48,57
X	NISHI S.: "cDNA cloning of the mammalian sterol C5-desaturase and the expression in yeast mutant" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Bd. 1490, 2000, Seiten 106-108, XP002245943 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	42,47, 48,57
X	WO 98 45457 A (MONSANTO CO) 15. Oktober 1998 (1998-10-15) Ansprüche 6,16 ---	42,47,48
P,X	WO 02 061072 A (KARUNANANDAA BALASULOJINI ;MONSANTO TECHNOLOGY LLC (US); POST-BEIT) 8. August 2002 (2002-08-08) Seite 72-73; Anspruch 6 -----	42-48, 53-55

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03 00592

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

Erfindung 1

Ansprüche 1-3 (teils), 4-7, 16-41(teils)

Methoden zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol oder seiner Zwischen- und Folgeprodukte charakterisiert durch Erhöhung der Delta8-Delta7 Isomerase Aktivität

Erfindung 2

Ansprüche 1-3 (teils), 8-11, 16-41 (teils)

Methoden zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol oder seiner Zwischen- und Folgeprodukte charakterisiert durch Erhöhung der Delta5 Desaturase Aktivität

Erfindung 3

Ansprüche 1-3(teils), 12-15 , 16-41(teils)

Methoden zur Herstellung von 7-Dehydrocholesterol oder seiner Zwischen- und Folgeprodukte charakterisiert durch Erhöhung der Delta24 Reduktase Aktivität

Erfindungen 4-6

Ansprüche 42-57 jeweils teilweise

Nukleinsäurekonstrukte und damit transformierte Organismen enthaltend eines der drei obengenannten Enzyme allein oder in Kombination mit weiteren Enzymen.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT.....ationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/00592**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der Internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intr. altes Aktenzeichen

PCT/EP 03/00592

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5480805	A	02-01-1996	KEINE		
WO 9845457	A	15-10-1998	AU	724046 B2	07-09-2000
			AU	5709998 A	30-10-1998
			BR	9714439 A	21-03-2000
			CN	1247569 A	15-03-2000
			EP	0958370 A1	24-11-1999
			WO	9845457 A1	15-10-1998
			US	2002148006 A1	10-10-2002
WO 02061072	A	08-08-2002	WO	02061072 A2	08-08-2002

THIS PAGE BLANK (USPTO)